
Untersuchungen zur Prozessierung von Intermediaten der DNA-Doppelstrang- bruchreparatur in der Mitose nach Bestrahlung in der G2-Phase

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Johannes Wess

aus Hanau

Darmstadt 2016

D 17

Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich

Korreferentin: Prof. Dr. Gisela Taucher-Scholz

Tag der Einreichung: 03. Mai 2016

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Juli 2016



Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Zusammenfassung/Summary	1
2 Einleitung	5
2.1 Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit Materie	5
2.1.1 Der Photoeffekt	6
2.1.2 Der Compton-Effekt	8
2.1.3 Die Paarbildung	9
2.1.4 Die kohärente Streuung	10
2.1.5 Der Kernphotoeffekt	10
2.1.6 Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit lebenden Zellen	11
2.1.7 Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit DNA und ihre Folgen	12
2.2 Die DNA-Schadensantwort	13
2.2.1 Der Zellzyklus und die Zellzykluskontrolle	13
2.2.2 Zellzyklus-Checkpoints	16
2.3 DNA-Reparatur	18
2.3.1 DNA-Doppelstrangbruchreparatur	19
2.3.2 Auflösung von intermediären Reparaturstrukturen der HR	35
2.4 Zielsetzung	38
3 Material & Methoden	40
3.1 Material	40
3.1.1 siRNA	40
3.2 Inhibitoren	40
3.2.1 Antikörper	40
3.2.2 Verwendete Kits	41
3.2.3 Verwendete FISH-Sonden	41
3.2.4 Chemikalien	41
3.2.5 Zellkulturmedien	42
3.2.6 Lösungen	42
3.2.7 Verbrauchsmaterialien	43
3.2.8 Geräte	43
3.2.9 Zelllinien	44
3.2.10 PC-Softwares	45
3.3 Methoden	47
3.3.1 Zellkulturmethoden	47
3.3.2 Induktion von DNA-Schäden mittels Röntgenstrahlung	51
3.3.3 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen auf Deckgläsern	52
3.3.4 Chromosomale Studien	54
3.3.5 Mikroskopie	59
3.3.6 Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Giemsa gefärbten Chromosomen ...	60
3.3.7 Immunfluoreszenzmikroskopische Auswertung	60

3.3.8	Statistische Analyse	64
4	Ergebnisse	65
4.1	Zellzyklusanalysen in HR-defizienten CHO-Zelllinien	66
4.1.1	G2/M-Checkpointanalysen nach Bestrahlung in fixierten Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie	66
4.1.2	G2/M-Checkpointanalysen nach Bestrahlung mittels Lebendzellmikroskopie ...	68
4.2	DSB-Reparaturuntersuchungen in HR-defizienten Zelllinien.....	71
4.3	In der G2-Phase induzierte DNA-Schäden in der Mitose	73
4.3.1	γ H2AX-Focianalysen in der frühen Mitose	74
4.3.2	Untersuchungen von chromosomalen Brüchen in der frühen Mitose	76
4.3.3	γ H2AX-Focianalysen in der späten Mitose	79
4.3.4	Untersuchungen von chromosomalen Brüchen in der späten Mitose	81
4.3.5	γ H2AX-Focianalysen in Chromosomenspreitungen.....	84
4.3.6	γ H2AX-Focianalysen zu frühen Zeiten nach Bestrahlung in Chromosomen der G2-Phase von HeLa-Zellen	99
4.4	Untersuchungen zur Auflösung von strahleninduzierten HR-Intermediaten in der Mitose	103
4.4.1	Einfluss der Herunterregulierung von BLM und Mus81 mittels siRNA auf die DSB-Reparatur.....	104
4.4.2	Schwesterchromatidaustausche in der Mitose	110
4.4.3	γ H2AX-Focianalysen in G1	114
5	Diskussion	119
5.1	Einfluss von HR-Faktoren auf den G2/M-Übergang.....	119
5.2	Die Existenz von intermediären Reparaturstrukturen der HR in der Mitose	122
5.3	Auswirkung unreparierter HR-Strukturen in der Mitose auf das Chromosomenbruchlevel.....	124
5.4	Mechanismus zur Generierung der paarigen γ H2AX-Foci.....	126
5.5	Auflösung von strahleninduzierten HR-Intermediaten	132
5.6	Der Einfluss von BLM und Mus81 auf die DSB-Reparaturkapazität	133
5.7	Die Mus81-abhängige Auflösung von strahleninduzierten HR-Intermediaten in der Mitose.....	135
6	Ausblick	144
7	Literaturverzeichnis.....	145
8	Anhang	158
	Curriculum Vitae	158
	Danksagung	159
	Ehrenwörtliche Erklärung	160

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Photoeffekt	7
Abbildung 2: Der Compton-Effekt	8
Abbildung 3: Die Paarbildung.....	9
Abbildung 4: Die kohärente Streuung	10
Abbildung 5: Der Kernphotoeffekt	11
Abbildung 6: Der eukaryontische Zellzyklus und seine Checkpoints.....	16
Abbildung 7: Die MRN-abhängige DSB-Erkennung und die daran beteiligten Faktoren	21
Abbildung 8: Mechanismus des NHEJ	25
Abbildung 9: Mechanismus der klassischen HR (dHJ-Modell).....	30
Abbildung 10: Mechanismus des SDSA	31
Abbildung 11: Mechanismus der BIR.....	32
Abbildung 12: Mechanismus des SSA.....	34
Abbildung 13: Die Auflösung von HR-Intermediaten durch Helikasen und Nukleasen	36
Abbildung 14: Zellzyklusspezifische Differenzierung von fixierten Zellen	62
Abbildung 15: Mitotischer Index (MI) nach einer Bestrahlung mit 3 Gy in fixierten CHO- Zelllinien.....	67
Abbildung 16: Messung des MI von CHO HR-Mutanten und wt-Zellen mittels Lebendzell- mikroskopie.	69
Abbildung 17: γ H2AX-Foci-Reparaturkinetiken von CHO wt-Zellen und HR-Mutanten in der G2-Phase nach Bestrahlung mit 3 Gy.	72
Abbildung 18: γ H2AX-Focilevel in der Metaphase von CHO wt-Zellen und HR-Mutanten nach Bestrahlung in G2.....	75
Abbildung 19: Chromosomale Brüche in der Metaphase von CHO wt-Zellen und HR-Mutanten nach Bestrahlung in G2.	77
Abbildung 20: γ H2AX-Focilevel in Meta- und Anaphase von CHO wt-Zellen und HR- Mutanten nach Bestrahlung in G2.	80
Abbildung 21: Chromosomale Brüche in der Meta- und Anaphase von CHO wt-Zellen und HR-Mutanten nach Bestrahlung in G2.	82
Abbildung 22: γ H2AX-Focianalysen in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen in CHO wt- Zellen und HR-Mutanten.....	86

Abbildung 23: Verteilung der paarigen γ H2AX-Foci auf Metaphase-Chromosomen von CHO wt-Zellen und HR-Mutanten nach Bestrahlung in G2.	88
Abbildung 24: Metaphase-Chromosomen von CHO wt-Zellen mit γ H2AX-Foci und Telomer-Sonden.....	89
Abbildung 25: γ H2AX-Focianalysen in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen in HeLa-Zellen.....	91
Abbildung 26: γ H2AX-Focianalysen in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen in wt- und HR-defizienten HeLa-Zellen.	93
Abbildung 27: γ H2AX-Focianalysen in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen in HeLa-Zellen nach siRNA-induzierter Inhibierung unterschiedlicher Reaktionsschritte der HR.	97
Abbildung 28: γ H2AX-Focianalysen in G2-bestrahlten G2-Phase- und Metaphase-Chromosomen von HeLa-Zellen.	101
Abbildung 29: γ H2AX-Focianalysen in HeLa-Zellen nach BLM- und Mus81-Herunterregulierung und Bestrahlung mit 2 Gy.	106
Abbildung 30: Chromatidbruchanalysen in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen von HeLa-Zellen nach Herunterregulierung von BLM und Mus81.	109
Abbildung 31: SCE-Analysen in Calyculin und Colcemid behandelten HeLa-Zellen nach BLM- und Mus81-Herunterregulierung und Bestrahlung mit 2 Gy.....	112
Abbildung 32: γ H2AX-Focianalysen in G2-bestrahlten G1-Phasezellen von 82-6hTert-Zellen nach Mus81- und BLM-Herunterregulierung.	116

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete siRNAs mit ihrer Sequenz und eingesetzten Konzentration	40
Tabelle 2: Verwendete Inhibitoren	40
Tabelle 3: Eingesetzte Primär-Antikörper und eingesetzte Verdünnung	40
Tabelle 4: Verwendete Sekundär-Antikörper und eingesetzte Verdünnung.....	41
Tabelle 5: Konzentrationen, Inkubationszeiten und die jeweils depletierten Proteine der eingesetzten siRNAs	49
Tabelle 6: Ansätze zur Transfektion von HeLa- und 82-6hTert-Zellen mit siRNA	49
Tabelle 7: Kombinationen, Verdünnungen und Inkubationszeiten der Antikörper bei der Immunfluoreszenzfärbung in fixierten Zellen	53

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	<i>p53 binding protein 1</i>
alt-NHEJ	alternatives NHEJ
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
BIM1	<i>BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger</i>
BIR	<i>break-induced replication</i>
Blap75	<i>BLM associated protein of 75 kDa</i>
BLM	Bloom-Syndrom-Protein
bp	Basenpaar
BRCA1/2	<i>breast cancer susceptibility gene 1/2</i>
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
c-NHEJ	kanonisches NHEJ
Cdc25c	<i>cell division cycle 25c</i>
Cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CFS	<i>common fragile site</i>
Chk1/2	<i>checkpoint kinase 1/2</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CO ₂	Kohlendioxid
ChIP	<i>chromatin immunoprecipitation</i>
CtIP	<i>C-terminal binding protein interacting protein</i>
CuSO ₄	Kupfersulfat
Cy5	Cyanin 5
D-Loop	<i>displacement loop</i>
dbzgl.	diesbezüglich
dHJ	Doppel-Holliday-Junction
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
Dna2	<i>DNA replication nuclease 2</i>
DNA-PK	<i>DNA dependent protein kinase</i>

DNA-PKcs	<i>DNA dependent protein kinase catalytic subunit</i>
DNAse	Desoxyribonuklease
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin
Eme1	<i>essential meiotic structure-specific endonuclease 1</i>
Eme2	<i>essential meiotic structure-specific endonuclease subunit 2</i>
Ercc1	<i>excision repair cross-complementation group 1</i>
Exo1	Exonuklease 1
FB	Fachbereich
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
FpG	Fluoreszenz plus Giemsa
FEN1	<i>Flap-Endonuklease 1</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
Gadd45	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible protein</i>
Gen1	<i>flap endonuclease GEN homolog 1</i>
ggf.	gegebenenfalls
Gy	Gray (Strahlendosis)
h-Tert	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
(γ)H2AX	(phosphoryliertes) Histon 2AX
HCl	Salzsäure
HJ	Holliday Junction
HR	homologe Rekombination
IR	<i>ionizing radiation</i> , ionisierende Strahlung
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
Ku70/80	<i>ATP-dependent DNA helicase 2 subunit KU70/80</i>
LET	<i>linear energy transfer</i> , lineare Energietransfer
Lig3	Ligase 3
MDC1	<i>mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MI	mitotischer Index
MilliQ	Reinstwasser
MPF	<i>mitosis-promoting factor</i>
MRE11	<i>meiotic recombination 11</i>

MRN-Komplex	MRE11-RAD50-NBS1-Komplex
Mus81	<i>MMS and UV sensitive 81</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome</i>
NEAA	<i>non-essential amino acids</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NES	<i>nuclear export signal</i>
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i>
PARP1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCC	<i>premature chromosome condensation</i>
pH3	phosphoryliertes Histon 3
PICH	<i>Plk1-interacting checkpoint helicase</i>
PIKK	<i>phosphoinositide 3-kinase related protein kinase</i>
Plk1/3	<i>polo-like kinase 1/3</i>
PP1/2A	Serin/Threonin Proteinphosphatase 1/2A
Pol	DNA-Polymerase
Rad	<i>radiation repair protein</i>
RecQ	<i>ATP-dependent DNA helicase RecQ</i>
RING1B	<i>putative E3 ubiquitin-protein ligase RING1b</i>
Rmi1	<i>RecQ-mediated genome instability 1</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RNF8/168	<i>ring finger protein 8/168</i>
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAC	<i>spindle assembly checkpoint</i> , Spindel-Assemblierungs-Checkpoint
SCE	<i>sister chromatid exchange</i> , Schwesterchromatidaustausch
SDSA	<i>synthesis-dependent strand annealing</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Slx1	<i>structure-specific endonuclease catalytic subunit</i>
Slx4	<i>SLX4 structure-specific endonuclease subunit</i>
Spo11	<i>Spo11 meiotic protein covalently bound to DSB</i>

sog.	sogenannt
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
TopoIII α	<i>topoisomerase (DNA) III alpha</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V(D)J	<i>variable (diversity) joining</i>
Verd.	Verdünnung
WRN	<i>Werner syndrome ATP-dependent helicase</i>
wt	Wildtyp
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XPF	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group F, DNA repair endonuclease XPF</i>
XRCC	<i>X-Ray repair cross-complementing protein</i>
Yen1	<i>Holliday junction resolvase YEN1</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung/Summary

Der DNA-Doppelstrangbruch (DSB) zählt zu der schwerwiegendsten Form von DNA-Läsionen. Er kann endogen als Folge von Replikationsstress, im Zuge der Meiose und der V(D)J-Rekombination sowie durch freie Radikale, die während des natürlichen Metabolismus der Zelle freigesetzt werden, induziert werden. Ebenso können DSBs exogen durch chemische Substanzen oder durch die Wechselwirkung mit ionisierender Strahlung verursacht werden. DSBs können zu Genmutationen führen, die die korrekte Proteinbiosynthese und damit die Funktion wichtiger Proteine gefährden. Sofern es sich dabei um Proteine handelt, die das Zellwachstum regulieren, kann dies ein unkontrolliertes Wachstum der Zellen zur Folge haben und dadurch das Risiko einer Tumorgenese erhöhen. Beim Eintritt einer DSB-geschädigten Zelle in die Mitose oder Meiose, kann es zu einer fehlerhaften Chromatiden- oder Chromosomenteilung und daraus resultierend zu einer Gefährdung der genomischen Integrität der Tochterzellen bzw. nachfolgender Generationen kommen. Allerdings verfügt die eukaryontische Zelle mit der Nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) und der homologen Rekombination (HR) über Reparaturmechanismen, um DSBs zu reparieren. Darüber hinaus ermöglicht im Rahmen der DNA-Schadensantwort das enge Zusammenspiel von Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur durch die Aktivierung unterschiedlicher Zellzykluskontrollpunkte (Checkpoints) eine Arretierung von geschädigten Zellen an bestimmten Punkten im Zellzyklus. Dies gewährt den DNA-Reparaturmechanismen mehr Zeit für die Reparatur und unterbindet somit ein Mitführen von DNA-Schäden in die darauffolgende Zellzyklusphase. Nach abgeschlossener Reparatur wird der jeweilige Checkpoint wieder aufgehoben und die Zelle in die entsprechend nächste Zellzyklusphase entlassen.

Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten in humanen Zellen dem G2/M-Checkpoint jedoch eine Insensitivität gegenüber DSBs nachweisen und zeigen, dass G2-Phasezellen nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung mit unreparierten DSBs in die Mitose eintreten. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Checkpointaufhebung die Reparatur über den Mechanismus der HR noch nicht abgeschlossen ist. Diese beiden Erkenntnisse führten gemeinsam zu der Hypothese, dass der G2/M-Checkpoint vor Abschluss der Reparatur aufgehoben wird und folglich G2-Phasezellen mit intermediären Reparaturstrukturen der HR, wie D-Loops oder Holliday Junctions, in die Mitose eintreten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte diese Hypothese näher untersucht werden sowie der Frage nach der weiteren Prozessierung der möglichen intermediären Reparaturstrukturen in der Mitose nachgegangen werden.

Im ersten Teil der Dissertation konnten in Übereinstimmung mit den früheren Beobachtungen auch im CHO-Zellsystem dem G2/M-Checkpoint nach Bestrahlung eine Insensitivität gegenüber DSBs sowie eine Aufhebung des Checkpoints zu Zeiten, zu denen die Reparatur über den Mechanismus der HR noch aktiv ist, nachgewiesen werden. Mit Hilfe von DSB-Reparaturuntersuchungen konnte auf die Existenz von intermediären Reparaturstrukturen der HR, wie D-Loops oder Holliday Junctions, in der Mitose geschlossen werden. Darüber hinaus konnte diesen Strukturen eine stabilisierende Wirkung auf das Chromatin nachgewiesen werden, welche im Zuge der Chromatinkondensation eine Umwandlung von DSBs in Chromatidbrüche unterbindet und somit einen weiteren Beitrag zur Wahrung der genomischen Integrität der Zelle beigesteuert. Zudem wurde bei den Analysen in fixierten CHO wt-Zellen ein strahleninduzierter Anstieg des γ H2AX-Focilevels von Metaphase zu Anaphase beobachtet, während dieser Anstieg auf Chromatidbruchebene sowie generell bei HR-Mutanten ausblieb. Daraus entwickelte sich die Hypothese, dass es im Zuge der HR während der Stranginvasion zu einer Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals vom geschädigten Strang auf den intakten Donorstrang kommt. In fixierten Metaphase-Zellen erscheinen die beiden in enger räumlicher Nähe zueinander liegenden γ H2AX-Foci methodenbedingt als einzelner Focus und können erst nach der Chromatidentrennung während der Anaphase als zwei einzelne Foci detektiert werden. Durch die Etablierung einer neuen Methode in unserem Labor, die die Immunfluoreszenzfärbung mit der Chromosomenstudie kombiniert und dadurch γ H2AX-Focianalysen auf kondensierten Chromosomen ermöglicht, konnte die Existenz von paarigen, auf beiden Schwesterchromatiden gegenüberliegenden γ H2AX-Foci auch in der Metaphase nachgewiesen werden. Entgegen der anfänglichen Annahme zeigten weitere Analysen allerdings, dass die Generierung der γ H2AX-Doppelfoci auf einen HR-unabhängigen Mechanismus zurückzuführen ist.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Auflösung der in der G2-Phase induzierten HR-Intermediate hauptsächlich in der darauffolgenden, frühen Mitose erfolgt und u. a. durch die Endonuklease Mus81 katalysiert wird. Im Zuge der Chromatidentrennung während der Anaphase verhindert dies ein mechanisches Auseinanderreißen der Chromatin-Verwickelungen durch die Zugkräfte des Spindelfaserapparates und bewahrt dadurch die Zelle vor der Generierung komplexer, schwer reparierbarer DSBs.

The DNA double-strand break (DSB) is one of the most toxic lesions. DSBs can endogenously be induced as a result of replication stress, during meiosis and V(D)J recombination, or by free radicals, which are generated during metabolism. Exogenously, DSBs can be induced by chemical agents or ionising radiation (IR). DSBs can lead to gene mutations which may jeopardize accurate protein synthesis and thereby cause dysfunction of essential proteins. Defective proteins which are involved in cell cycle regulation may cause uncontrolled cell division and by that, increase the risk of tumorigenesis. Entering mitosis or meiosis with DSBs may result in an incorrect segregation of sister chromatids or chromosomes and jeopardize genome integrity of the cell and next generations, respectively. To maintain the integrity of their genomes, eukaryotes have evolved cellular networks, including mechanisms of DNA repair, activation of cell cycle checkpoints, regulation of transcriptional programs and initiation of apoptosis, collectively termed the DNA damage response (DDR). DSBs are repaired by two major pathways, the non-homologous end-joining (NHEJ) and the homologous recombination (HR). By activating checkpoints, cells are arrested at specific stages within the cell cycle to allow longer repair times and to prevent progression into critical cell cycle phases with unrepaired DNA damage. After completion of repair, checkpoints are abrogated and the cells are released into the next cell cycle phase.

Previous studies in human cells have demonstrated an insensitivity of the G2/M checkpoint to DSBs. After IR, the G2/M checkpoint is rapidly initiated but cells are released from G2 arrest with unrepaired DSBs, exhibiting 10 - 20 DSBs in mitosis. Furthermore, it has been shown that DSB repair by HR is still in progress at the time of G2/M checkpoint abrogation. These observations suggest that the G2/M checkpoint is abrogated prematurely before DSB repair is completed and cells enter mitosis with DNA structures like D-loops or Holliday junctions which arise during intermediate stages of HR. The aim of this study was to investigate this hypothesis and the dissolution of these possible HR intermediates in mitosis.

In the first part of this work the insensitivity of the G2/M checkpoint and the abrogation of the G2/M checkpoint at a point when HR was still in progress was confirmed in CHO cells. The existence of HR repair intermediates in mitosis was pointed out by various DSB analysis. Furthermore, these analysis revealed that HR intermediates stabilize and prevent DSBs from being converted into chromatid breaks during chromatin condensation.

γ H2AX foci analysis in fixed G2-irradiated wt cells displayed an increase of the γ H2AX foci level from metaphase to anaphase, while this increase was not observed in HR mutants and in chromatid break analysis. This primarily suggested that the H2AX phosphorylation signal is transferred from the damaged DNA strand to the donor strand during the strand invasion step of HR. By combining the chromosomal studies with the immunofluorescence technique, a

method was established in our lab which allowed γ H2AX foci analysis on chromosome spreads and thereby more precise investigations on this assumption. Although paired γ H2AX foci were detected at opposite positions of sister chromatids, further experiments reveal an HR-independent generation of these foci, disproving the primarily hypothesis.

The second part of this work focused on the resolution of HR intermediate structures. Analysis of sister chromatid exchanges (SCEs) demonstrated that IR-induced HR intermediates of G2-phase cells are resolved in mitosis in an Mus81-dependent manner. Thus, Mus81 serves to prevent the chromatin entanglements from being torn apart by the spindle apparatus during segregation and thereby prevents the *de novo* formation of complex DSBs.

2 Einleitung

Als Strahlung bezeichnet man den Transport von Energie in Form von Wellen oder Teilchen durch ein Medium oder den Raum. Dabei unterscheidet man zwischen ionisierender und nichtionisierender Strahlung. Im Gegensatz zu der nichtionisierenden Strahlung ist die Energie der ionisierenden Strahlung hoch genug, um beim Auftreffen auf Materie Elektronen aus deren Atom- oder Molekülverbund zu lösen. Dieser Vorgang ist endotherm und wird als Ionisation bezeichnet. Je nach Atom, chemischer Bindung, Molekül und Ladungszustand der bestrahlten Materie werden hierfür unterschiedliche Energien benötigt.

Die elektromagnetische Wellenstrahlung umfasst ein breites Energiespektrum. Nur die energiereichen Strahlenarten, wie die Gammastrahlung, die Röntgenstrahlung und die sehr kurzwellige UV-Strahlung (mit einer Quantenenergie von mindestens 12,4 eV) sind in der Lage, die benötigte Ionisationsenergie aufzubringen. Die energieärmeren, elektromagnetischen Strahlungsarten, wie langwellige UV-Strahlung, sichtbares Licht, Infrarot, Mikro- und Radiowellen, weisen keine ionisierenden Eigenschaften auf. Darüber hinaus können auch beschleunigte Teilchen beim Auftreffen auf Materie Ionisationen auslösen. Dazu zählen geladene Teilchen, wie Protonen und Elektronen mit einer kinetischen Energie ab etwa 5 eV, die beim α -Zerfall freigesetzten α -Teilchen (doppelt-positiv geladene Heliumkerne), sowie die beim β -Zerfall aus den Atomkernen emittierten Elektronen bzw. Positronen. Ebenfalls wirken die in der kosmischen Strahlung auftretenden und in der Strahlentherapie eingesetzten Schwerionen, wie beispielsweise Kohlenstoffionen, ionisierend. Desweiteren zählen auch freie, ungeladene Neutronen zur ionisierenden Strahlung.

2.1 Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit Materie

Nahezu alle Arten von ionisierender Strahlung wechselwirken beim Aufprall auf Materie bevorzugt mit den Elektronen der Atomhülle der bestrahlten Materie. Daneben ist aber auch eine Interaktion mit den Atomkernen möglich. Dabei ist bei der Ionisierung zwischen einem direkten und indirekten Effekt zu unterscheiden. Direkt ionisierend wirken alle geladenen Teilchen, wie Elektronen, Protonen und Schwerionen, sowie die geladenen Teilchen des α - bzw. β -Zerfalls (α -Teilchen, bzw. Elektronen und Positronen). Beim Auftreffen auf Materie reagieren die geladenen Teilchen durch Stoßbewegungen direkt mit den Elektronen der Atomhülle der bestrahlten Materie und rufen dadurch eine Ionisation hervor. Ungeladene Teilchen, wie beispielsweise Neutronen, wirken indirekt ionisierend. Freie Neutronen können entweder von Atomkernen eingefangen werden, oder durch eine Kollision mit Protonen und

Atomkernen elastische Stöße erzeugen, bei denen sie einen Teil ihrer kinetischen Energie abgeben. In beiden Fällen entstehen angeregte bzw. elektrisch geladene Sekundärteilchen, die nun selbst ionisierend wirken und die umgebene Materie ionisieren können. Obwohl ein Photon beim Auftreffen auf Materie eine direkte Ionisation induzieren kann, zählt die Photonenstrahlung (Gamma- und Röntgenstrahlung) dennoch zu der indirekt ionisierenden Strahlung. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die bei der Ionisation durch Photonen freigesetzten Sekundärelektronen bei ihrer anschließenden Flugbahn eine weitaus höhere Anzahl an Ionisationen durchführen, als die Photonen selbst. Generell ist bei allen Strahlenarten zu beobachten, dass die Sekundärelektronen weitere Ionisationen in der umgebenden Materie durchführen können, nachdem sie aus der Atomhülle der bestrahlten Materie gelöst wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte bei den Experimenten die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) in den verschiedenen Zelllinien durch Röntgenstrahlung. Aus diesem Grund werden in den folgenden Kapiteln für ein grundlegendes Verständnis die dabei stattfindenden, unterschiedlichen Wechselwirkungsprozesse zwischen Photonenstrahlung und Materie näher beschrieben (in Anlehnung an Hanno Krieger 2007).

2.1.1 Der Photoeffekt

Bei der elektromagnetischen Wellenstrahlung erfolgt die Energieübertragung auf die bestrahlte Materie durch Photonen oder Quanten. Dabei kann es in Abhängigkeit von den Ordnungszahlen der bestrahlten Elemente sowie von den einfallenden Photonenenergien zu unterschiedlichen Wechselwirkungsprozessen kommen.

Bei dem sog. Photoeffekt wird die gesamte Energie des einfallenden Photons auf ein Elektron der Atomhülle übertragen, dieses Elektron aus der Atomhülle gestoßen und somit das Atom ionisiert. Dabei reagieren die Photonen bevorzugt mit den stark gebundenen Elektronen, welche sich auf den inneren K-, L- oder M-Schalen der Atome befinden. Die Wahrscheinlichkeit für eine Wechselwirkung des einfallenden Photons mit einem Elektron auf der innersten K-Schale steigt mit zunehmender Ordnungszahl des bestrahlten Elementes. Das Elektron übernimmt die Differenz zwischen Photonenenergie und Elektronenbindungsenergie als Bewegungsenergie, verlässt den Atomverbund und kann nun selbst durch Wechselwirkungen mit anderen Atomen Ionisationen durchführen oder seine kinetische Energie in Form der sogenannten Bremsstrahlung abgeben. Dementsprechend muss die Energie des einfallenden Photons größer sein als die Bindungsenergie des zu stoßenden Elektrons, um das Atom durch den Prozess des Photoeffektes zu ionisieren. Der Ausstoß eines

kernnahen Elektrons hat ein Elektronenloch auf einer inneren Schale zur Folge. Aufgrund dessen, dass Atome stets den energetisch günstigsten Zustand, und damit eine Vollbesetzung der inneren Schalen bestreben, wird das Elektronenloch unmittelbar nach dem Elektronenausstoß durch ein Elektron der nächstgelegenen, äußeren Schale wieder aufgefüllt. Da sich das auf der äußeren Schale liegende Elektron auf einem höheren Energieniveau befindet, gibt es beim Auffüllen der inneren Schale die überschüssige Energie ab. Diese Energie kann entweder auf ein anderes Elektron des selben Atoms übertragen werden, welches anschließend die Atomhülle als sogenanntes Auger-Elektron mit einer bestimmten kinetischen Energie verlässt, oder als charakteristische Photonenstrahlung (oder charakteristische Röntgenstrahlung in Bezug auf das jeweilige bestrahlte Element) emittiert werden. Vor allem bei Elementen mit niedrigen Ordnungszahlen werden Auger-Elektronen gelöst, während Elemente mit hohen Ordnungszahlen die charakteristische Photonenstrahlung emittieren.

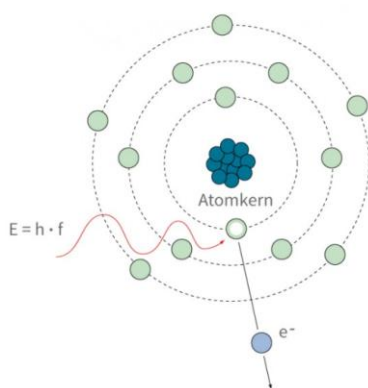


Abbildung 1: Der Photoeffekt

Beim Photoeffekt trifft ein Photon bevorzugt auf ein Elektron der inneren Schalen der Atomhülle. Dabei entspricht seine Energie dem Produkt des Planck'schen Wirkungsquantums (h) und der Frequenz des Photons (f). Die gesamte Energie des eintreffenden Photons wird auf das Elektron übertragen, welches daraufhin die Atomhülle verlässt und mit der Energie des Photons abzüglich seiner Bindungsenergie als Sekundärelektron weitere Ionisationen durchführen kann. Der Photoeffekt ist der dominierende Effekt bei niedrigen Photonenenergien bis zu einigen 100 keV.

(Abbildung nach Onmeda (1))

Der photoelektrische Effekt ist bei niedrigen Photonenenergien vorherrschend. Die Wahrscheinlichkeit der Photoabsorption ist dabei maximal, wenn die Photonenenergie und die Bindungsenergie der Elektronenschale exakt übereinstimmen. Bei schwächeren Photonenenergien werden bevorzugt die Elektronen der äußeren Schalen vom Atomverbund gelöst. Mit steigender Ordnungszahl der bestrahlten Materie steigt die Wahrscheinlichkeit des Photoeffektes auch bei höheren Energien und überwiegt in hochatomigen Absorbern bis zu Photonenenergien von einigen 100 keV, während es bei der Wechselwirkung mit Elementen niedriger Kernladungszahl bereits ab Energien von etwa 30 keV zum sogenannten Compton-Effekt kommt.

2.1.2 Der Compton-Effekt

Der nach dem amerikanischen Physiker Arthur Holly Compton benannte Compton-Effekt beschreibt die Wechselwirkung zwischen Photonen und Materie für Photonenenergien, die größer als die Bindungsenergien der Elektronenschalen sind. Abhängig von der Kernladungszahl der bestrahlten Materie ist bei der Photonenstrahlung mit einer Energie von etwa 30 keV bis 30 MeV der Compton-Effekt der maßgebliche Wechselwirkungsprozess im tierischen Gewebe.

Im Gegensatz zum Photoeffekt wird das einfallende Photon beim Compton-Effekt nicht absorbiert, sondern gestreut. Anders als bei der unter Kapitel 2.1.4 beschriebenen kohärenten Streuung findet jedoch beim Compton-Effekt eine Energieübertragung vom einfallenden Photon auf das Elektron der Atomhülle statt, weshalb der Prozess auch als inkohärente Streuung bezeichnet wird. Unabhängig von der Kernladungszahl reagiert der Strahlenquant mit einem schwach gebundenen Elektron der äußeren Schale, wobei die Wechselwirkung als elastischer Stoß charakterisiert werden kann. Die Energie des Photons ist dabei so hoch, dass sie nicht vollständig auf das Elektron übertragen werden kann. Bei dem Aufprall werden Energie und Impuls des einfallenden Photons in Abhängigkeit vom Photonenstreuwinkel auf das Elektron (Compton-Elektron) und das gestreute Photon verteilt, wodurch das Compton-Elektron mit einer bestimmten kinetischen Energie aus der Atomhülle gelöst und somit das Atom ionisiert wird. Bei ausreichend hoher kinetischer Energie kann das herausgestoßene Compton-Elektron weitere Ionisationen in anderen Atomen ausüben. Mit steigender Photonenenergie und zunehmenden Photonenstreuwinkel erhöht sich auch die auf das Compton-Elektron übertragene Energie. Gleichzeitig nimmt jedoch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des Compton-Effektes mit steigender Photonenenergie ab.

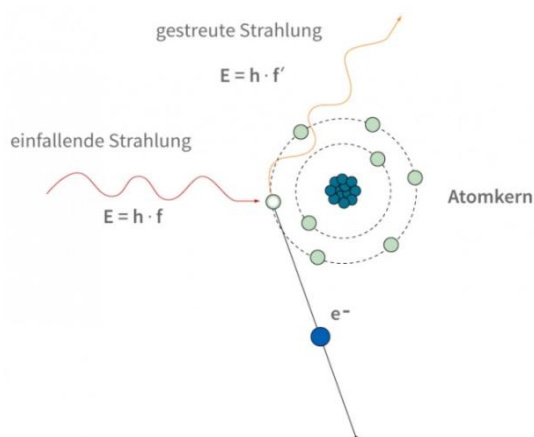


Abbildung 2: Der Compton-Effekt

Beim Compton-Effekt wechselwirkt ein Photon mit einer höheren Energie als die Bindungsenergien der Elektronenschalen mit einem Hüllenelektron der äußeren Schalen, stößt dieses aus dem Atomverbund und wird dabei selbst inkohärent gestreut. Die Energie wird dabei auf das gestreute Photon und das aus dem Atomverbund gestoßene Compton-Elektron, welches bei ausreichender kinetischer Energie weitere Ionisationen durchführen kann, verteilt. Der Compton-Effekt ist bei Photonenenergien von etwa 30 keV bis 30 MeV der dominierende Wechselwirkungsprozess mit tierischen Geweben.

(Abbildung nach Onmeda (1))

Für Photonenstrahlung mit einer Energie größer als 1 MeV besteht mit dem Prozess der Paarbildung noch eine weitere Wechselwirkungsmöglichkeit von Photonen mit Materie.

2.1.3 Die Paarbildung

Während beim Photo- und Compton-Effekt eine direkte Wechselwirkung zwischen den einfallenden Photonen und den einzelnen Elektronen der Atomhülle der bestrahlten Materie stattfindet, wechselwirken die Photonen bei dem Prozess der Paarbildung mit dem elektrischen Feld von geladenen Teilchen oder Atomkernen. Bei der Paarbildung wird die Photonenenergie in Masse umgewandelt, genauer in ein Elektron und ein Positron (Elektron-Positron-Paar). Für diesen Prozess muss die Energie des einfallenden Photons größer als das Energie-Masse-Äquivalent für zwei Elektronen sein. Erfolgt die Paarbildung durch Wechselwirkungen mit dem elektrischen Feld des Atomkerns, so ist eine Photonenenergie von mindestens 1022 keV nötig, während die Paarbildung durch die Wechselwirkung mit dem elektrischen Feld eines Elektrons der Atomhülle erst ab einer Photonenenergie von 2044 keV möglich ist. Bei der Paarbildung durch das elektrische Feld des Atomkerns wird das Photon vollständig absorbiert und aus seiner Energie ein Elektron und ein Positron gebildet. Die Restenergie wird ungezielt als kinetische Energie auf die beiden neugebildeten Teilchen übertragen. Bei dem Prozess bleibt der Atomkern unberührt. Seltener erfolgt die Paarbildung durch Wechselwirkungen des einfallenden Photons mit dem elektrischen Feld eines Elektrons der Atomhülle. Dabei wird aufgrund der im Vergleich zum Atomkern geringeren Masse das Elektron durch den bei der Paarbildung übertragenen Impuls aus dem Atomverbund gelöst und zusätzlich zu dem aus der Photonenenergie erzeugten Elektron-Positron-Paar vom Atom emittiert (Triplettbildung). Unabhängig vom Wechselwirkungspartner geben die beschleunigten Elektronen und Positronen ihrerseits die übertragene Bewegungsenergie durch Wechselwirkungen in Form von elastischen Stößen an die umgebende Materie ab. Beim Stoß auf Elektronen der Materie werden die Positronen in kürzester Zeit unter der Emission von Photonen vernichtet, weshalb diese Form der Strahlung auch als Vernichtungsstrahlung bezeichnet wird.

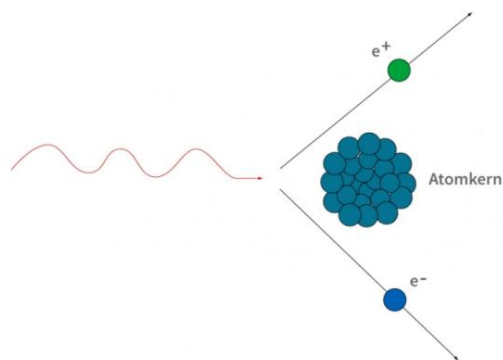


Abbildung 3: Die Paarbildung

Photonen mit einer Energie ab 1022 keV wechselwirken mit dem elektrischen Feld von Atomkernen der bestrahlten Materie. Dabei wird das Photon vollständig absorbiert und seine Energie in ein Elektron und ein Positron umgewandelt. Die verbleibende Restenergie wird als kinetische Energie zufällig auf die beiden neuentstandenen Teilchen übertragen. Seltener findet eine Wechselwirkung zwischen einem Photon mit einer Energie ab 2044 keV und dem elektrischen Feld eines Elektrons der Atomhülle statt. Hierbei wird zusätzlich zu dem Elektron-Positron-Paar ein Elektron aus der Elektronenhülle gestoßen (Triplettbildung).

(Abbildung nach Onmeda (2))

Die Wahrscheinlichkeit des Prozesses der Paarbildung steigt mit größeren Photonenenergien und höheren Ordnungszahlen der bestrahlten Materie. Zwar ist die Paarbildung ab einer Photonenenergie von 1022 keV möglich, tatsächlich tritt sie aber erst ab deutlich höheren Energien auf.

2.1.4 Die kohärente Streuung

Während die Prozesse des photoelektrischen Effektes, des Compton-Effektes und der Paarbildung die Absorption der einfallenden Photonen beschreiben, können die Photonen auch über den Mechanismus der Streuung mit der Materie wechselwirken. Bei der kohärenten Streuung (auch klassische Streuung oder Rayleigh-Streuung genannt) kommt es zu keiner irreversiblen Energieübertragung. Durch den Zusammenstoß mit einem fest gebundenen Elektron der Atomhülle erfährt das einfallende Photon eine Richtungsänderung ohne seine Energie zu verlieren. Der Stoß versetzt das getroffene Elektron zusammen mit den anderen Elektronen der Atomhülle in eine vorübergehende Schwingung. Die Schwingung der Elektronen hat dabei dieselbe Frequenz wie die des einfallenden Photons. Unmittelbar nach der Übertragung der Schwingung leiten die Elektronen die Schwingung wieder auf das Photon, welches dadurch mit derselben Energie wie vor dem Stoß in einem bestimmten Winkel zum Elektron gestreut wird.

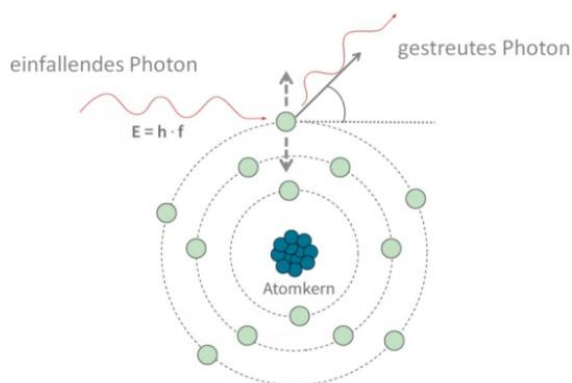


Abbildung 4: Die kohärente Streuung

Bei der kohärenten Streuung trifft das einfallende Photon auf ein Elektron der Atomhülle und versetzt dieses in Schwingung. Unmittelbar danach wird die Schwingung wieder auf das Photon übertragen, welches dadurch ohne Energieverlust in einem bestimmten Winkel zum Elektron gestreut wird.

(Abbildung verändert nach Onmeda (1))

Der Prozess der kohärenten Streuung spielt vor allem bei Elementen mit geringen Kernladungszahlen bei niedrigen Photonenenergien bis etwa 20 keV eine Rolle.

2.1.5 Der Kernphotoeffekt

Durch die Wechselwirkung ihres elektromagnetischen Feldes können Photonen hoher Energien auch mit den Protonen oder Neutronen von Atomkernen reagieren. Dabei absorbiert der Atomkern die Energie eines einfallenden Photons und wird dadurch angeregt. Sofern die

übertragene Energie größer als die Bindungsenergie der Nukleonen ist, kann es zur Emission von Protonen oder Neutronen mit einer bestimmten kinetischen Energie kommen. Die dafür benötigten Photonenenergien bewegen sich im Bereich von etwa 6 - 20 MeV.

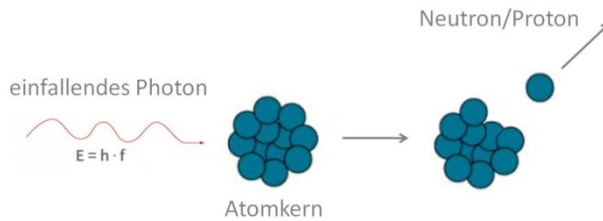


Abbildung 5: Der Kernphotoeffekt

Photonen hoher Energien wechselwirken mit Protonen oder Neutronen von Atomkernen. Ist die dabei übertragene Energie höher als die Bindungsenergie der Nukleonen, können Protonen und Neutronen emittiert werden.

(Abbildung verändert nach Onmeda (2))

2.1.6 Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit lebenden Zellen

Bei der Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit lebenden Zellen oder Geweben kommt es auf molekularer Ebene vor allem zur Schädigung der im Zellkern lokalisierten DNA, aber auch von Membranen, wie die des Zellkerns, der Zellorganellen oder der Zellmembran, und von weiteren organischen Verbindungen der Zelle (Biomoleküle). Dabei unterscheidet man zwischen einer direkten und einer indirekten Strahlenwirkung. Bei der direkten Strahlenwirkung wechselwirken die Photonen oder Teilchen der ionisierenden Strahlung unmittelbar mit den Molekülen der DNA (oder Biomolekülen) über die bereits beschriebenen physikalischen Wechselwirkungsprozesse (siehe Abschnitte 2.1.1 - 2.1.5). Bei der indirekten Strahlenwirkung wird dagegen zunächst ein anderes Molekül ionisiert, welches anschließend durch sekundäre, chemische Prozesse die DNA oder andere Biomoleküle schädigt. Da die Zellen zum größten Teil aus Wasser bestehen, erfolgt die primäre Wechselwirkung der Strahlung am häufigsten mit Wassermolekülen. Bei diesem als Radiolyse des Wassers bezeichneten Prozess kommt es zur Dissoziation der Wassermoleküle sowie zur Entstehung von freien Radikalen. Neben den besonders reaktionsfreudigen Wasserstoff- und Hydroxylradikalen werden dabei auch Elektronen und Protonen sowie weniger reaktive Produkte wie molekularer Wasserstoff und Wasserstoffperoxid gebildet. Hohe Sauerstoffkonzentrationen im Zytoplasma begünstigen die Radikalbildung und führen zur Entstehung von zusätzlichen Perhydroxyl- und Peroxid-Radikalen (Sauerstoffeffekt). Freie Elektronen werden unmittelbar nach ihrer Freisetzung hydratisiert und verhalten sich daraufhin wie freie Radikale. Für die Schädigung der Zelle sind maßgeblich die freien Radikale verantwortlich. Sie reagieren mit den organischen Molekülen der Zelle, indem sie den Verbindungen bevorzugt Wasserstoffatome entziehen. Bei den Wechselwirkungen mit der DNA der Zelle kommt es neben der Schädigung des Zucker-Phosphatrückgrats durch einen Wasserstoffatomentzug an den Basen auch zum Zusammenbruch der Wasserstoff-

brückenbindungen zwischen den jeweiligen Basenpartnern. Als biologische Folgen der strahleninduzierten Schädigung können zeitnah Beeinflussungen des Metabolismus sowie eine Schädigung von Membranen und Zellorganellen auftreten. Langfristig können Veränderungen des Genoms (Mutationen) und der Proteinbiosynthese erfolgen. Als mögliche Spätfolgen sind eine Krebserkrankung oder der Zelltod zu nennen. Im Laufe der Evolution hat die Zelle Mechanismen entwickelt, um die induzierten Strahlenschäden zu reparieren, ihre genomische Integrität zu bewahren und das Risiko von Langzeitschäden zu minimieren.

2.1.7 Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit DNA und ihre Folgen

In eukaryontischen Zellen hat die Strahlenexposition hauptsächlich die Schädigung des Erbguts zur Folge. Ionisierende Strahlung kann bei der Wechselwirkung mit der DNA eine Vielzahl von unterschiedlichen, chemischen Modifikationen bzw. Schäden hervorrufen. Bei einer Bestrahlung kommt es aufgrund des geringen Masseanteils der DNA in der Zelle vor allem durch sekundäre Prozesse, wie der Wechselwirkung der bei der Radiolyse des Wassers freigesetzten Radikale mit der DNA, zur Schädigung des Erbguts. Der bevorzugte Reaktionspartner ist dabei ein Wasserstoffatom eines DNA-Moleküls, welches durch das freie Radikal dem Molekülverbund entzogen wird und u. a. zur Auflösung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen führen kann. Der am häufigsten auftretende DNA-Schaden ist der Basenschaden. Die Basen werden dabei entweder chemisch modifiziert, oxidiert (8-oxo-Guanin), dimerisiert (Thymidin-Dimer), gegenüber fehlvernetzt (*crosslink*) oder vollständig aus der DNA-Doppelhelix entfernt. Schäden am Zucker-Phosphat-Rückgrat führen zur Ausbildung von Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen (DSBs), je nachdem, ob bei einem oder bei beiden Zucker-Phosphat-Rückgraten eine Läsion vorliegt.

Unreparierte DNA-Schäden können das Erbgut der Zelle verändern, was je nach Art der Modifikation schwerwiegende Folgen für die Zelle haben kann. Während unter den Genmutationen eine stille Mutation keine Auswirkungen auf den Metabolismus der Zelle hat, können andere Punktmutationen wie die Missense-Mutation, die Nonsense-Mutation oder die Frameshift-Mutation in wichtigen Genen den genetischen Code soweit verändern, dass daraus eine fehlerhafte Proteinbiosynthese der entsprechenden Proteine resultiert. Diese möglicherweise essentiellen Proteine können ihrerseits eine eingeschränkte bzw. keine Funktion aufweisen und somit den Metabolismus der Zelle beeinflussen. Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen können zu einer unkontrollierten Proliferation der Zellen führen und dadurch die Krebsentstehung begünstigen. Desweiteren können aus unreparierten DSBs Chromosomenaberrationen resultieren. Neben der Ringbildung und der

Chromosomenfusion können dabei auch ein Austausch, eine Inversion, eine Deletion, eine Duplikation und eine Translokation von ganzen Chromosomenstücken stattfinden. Während der anschließenden Mitose können dadurch in einigen Fällen die Schwesterchromatiden nicht exakt auf die beiden Tochterzellen aufgetrennt werden, oder es kann zum Verlust von bestimmten Chromosomenabschnitten kommen. Die Chromosomenmutationen können den betroffenen Zellen schwere Schäden zufügen oder sogar für die Zelle lethal sein. Treten Mutationen in der Meiose auf, so können sie an die Nachkommen vererbt werden und zu Krankheiten, Missbildungen oder sogar zum Tod führen.

2.2 Die DNA-Schadensantwort

Auf die Induktion von DNA-Schäden folgt die sogenannte DNA-Schadensantwort der Zelle, um die Schäden an der genetischen Information zu reparieren und dadurch die genomische Integrität der Zelle zu bewahren. Hierbei erfolgt ein koordiniertes Zusammenspiel zwischen Mechanismen der DNA-Reparatur, der Zellzykluskontrolle und der Apoptose (Jeggo und Löbrich 2006). Durch die Induktion von DNA-Schäden kommt es im Zuge der Zellzykluskontrolle zur Aktivierung der sogenannten Checkpoints (Kontrollpunkte). Diese unterbrechen die Proliferation bzw. das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus um zu verhindern, dass die Zelle mit DNA-Schäden in sensible Zellzyklusphasen wie der S-Phase oder der Mitose eintritt. Zusätzlich gewährt der Zellzyklus-Arrest den bereits aktivierten DNA-Reparaturmechanismen mehr Zeit für die Reparatur der DNA-Schäden. Nach abgeschlossener Reparatur werden die Checkpoints wieder aufgehoben und die Zellen in die jeweils nächste Zellzyklusphase entlassen. Bei irreparablen Schäden wird bei den Zellen der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet, um eine Vererbung der DNA-Schäden an die Tochterzellen auszuschließen.

2.2.1 Der Zellzyklus und die Zellzykluskontrolle

Als Zellzyklus bezeichnet man die Aufeinanderfolge von unterschiedlichen Phasen des Wachstums, der Replikation, der mitotischen Teilung (Zellkernteilung) und der Cytokinese (Cytoplasmateilung) in profilierenden, eukaryontischen Zellen (Abbildung 6). Dabei unterteilt man den Zellzyklus in zwei übergeordnete Hauptabschnitte, die Interphase und die Mitosephase (M-Phase). Die Interphase setzt sich aus zwei Wachstumsphasen, der G1- und der G2-Phase (vom englischen *gap* = Lücke), und einer DNA-Replikationsphase, der S-Phase (Synthese), zusammen. In der G1-Phase wird die Zelle für die darauffolgende DNA-Synthese

vorbereitet, in der G2-Phase für die anschließende Mitose. Während in der G1- und G2-Phase die Zelle durch die Proteinbiosynthese und die Produktion von cytoplasmatischen Organellen stetig wächst, ist die Hauptaufgabe der dazwischenliegenden S-Phase die Verdoppelung der Chromosomen. Nachdem die Vorbereitungen für die Zellteilung in der G2-Phase abgeschlossen sind, tritt die Zelle in die M-Phase ein. Diese setzt sich aus der Karyokinese (Zellkernteilung, Mitose) und der anschließenden Cytokinese zusammen. Alternativ zum Durchlaufen eines weiteren Zellzyklus können G1-Phasezellen in die sogenannte Ruhephase (G0-Phase) übergehen, in der kein Wachstum und keine Zellteilung stattfinden. Sofern keine vollständige Ausdifferenzierung der Zelle während der G0-Phase stattgefunden hat, kann die Zelle ebenso aus der G0-Phase wieder zurück in den Zellzyklus eintreten. G0-Phasezellen machen den größten Anteil an sich nicht-teilenden, nicht-wachsenden Zellen im menschlichen Körper aus.

Die Mitose gliedert sich mit der Prophase, der Prometaphase, der Metaphase, der Anaphase und der Telophase in fünf Abschnitte. Mit der Prophase beginnt die Kondensation des Chromatins (doppelter Chromosomensatz) sowie die Bildung des Spindelfaserapparates. Der Zerfall der Kernhülle während der Prometaphase ermöglicht anschließend die Bindung der Spindelfaser an die Kinetochore der jeweiligen, fast vollständig kondensierten Chromatiden und initiiert deren Transport zur Zellmitte. Bis zur Metaphase hat sich die Zellhülle vollständig zurückgebildet und der Spindelfaserapparat die Chromosomen auf einer Höhe entlang der Äquatorialebene ausgerichtet. In der Anaphase werden die jeweiligen Schwesterchromatiden voneinander durch den Spindelfaserapparat getrennt und zu den entgegengesetzten Zellpolen gezogen. Durch die Neubildung der Kernhülle, der Rückbildung der Spindelfasern und der Dekondensation der Chromatiden in der Telophase endet die Mitose. Nahezu zeitgleich setzt die Cytokinese ein und teilt das Cytoplasma durch den Einzug der Zellmembran zwischen den beiden Zellkernen auf die beiden Tochterzellen auf. Damit ist die Zellteilung abgeschlossen und zwei identische Tochterzellen mit einem einfachen Chromosomensatz sind entstanden.

Das Voranschreiten einer Zelle von einer Phase des Zellzyklus in die nächste wird durch das Zusammenspiel von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) streng reguliert. Cycline sind Proteine, die selbst keine enzymatische Aktivität besitzen. Im Verlauf des Zellzyklus ändert sich die Konzentration der verschiedenen Cycline periodisch und zeitversetzt. Durch die Bindung der Cycline an unterschiedliche, konstitutiv exprimierte Cyclin-abhängige Serin/Threonin-Proteinkinasen (Cdks) wird deren Kinasefunktion periodisch zu bestimmten Zeiten des Zellzyklus aktiviert (Morgan 1995; Pines 1995). Anschließend phosphorylieren die Cdks spezifische Proteine, die die Progression der Zelle innerhalb des Zellzyklus steuern. Im

Gegensatz zu den steigenden und sinkenden Konzentrationen der übrigen Cycline während des Zellzyklus, erfolgt die Synthese der Cycline vom Typ D durch eine Wachstumsfaktoren-vermittelte Stimulation (Assoian 1997). Die Bindungen der Cycline vom Typ D (Cyclin D1, Cyclin D2, Cyclin D3) an Cdk4 und Cdk6 sind für den Eintritt in die G1-Phase von entscheidender Bedeutung (Sherr 1993). Cyclin E interagiert in der späten G1-Phase mit Cdk2 und ermöglicht dadurch den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase und die Initiation der Replikation (Ohtsubo et al. 1995). Innerhalb der S-Phase wird an Cdk2 Cyclin E durch Cyclin A ersetzt, welches sowohl die weitere Initiation, als auch die Fertigstellung der DNA-Synthese kontrolliert (Girard et al. 1991; Pagano et al. 1992; Yam et al. 2002). Zur späten G2-Phase lagert sich Cyclin A an Cdk1 an und ermöglicht dadurch den Eintritt der Zelle in die Mitose. Die Bindung von Cyclin B an Cdk1 zu Beginn der M-Phase ist ein essentieller Schritt für die Bildung des *mitosis-promoting factor*, und damit für den Eintritt, sowie für die Initiierung der Mitose (King et al. 1994; Hara et al. 2012).

In der Interphase induzierte DSBs können bei der Chromatidentrennung während der späteren Mitose zu schweren Schäden führen, welche auf die Tochterzellen übertragen werden und somit die genomische Integrität der nachfolgenden Generationen gefährden. Um eine korrekte Zellteilung und damit die genomische Integrität der nachfolgenden Generationen sicherzustellen, verfügt die eukaryontische Zelle im Zuge der Zellzykluskontrolle durch die sogenannten Checkpoints über eine Art Kontrollmechanismus. Ihre Aktivierung kann den Zellzyklus zu bestimmten Zeiten verzögern oder unterbrechen, um der Zelle mehr Zeit für die Reparatur der DSBs zu gewähren (siehe Kapitel 2.2.2). Bei komplexeren, irreparablen Schädigungen wird bei den Zellen die Apoptose eingeleitet.

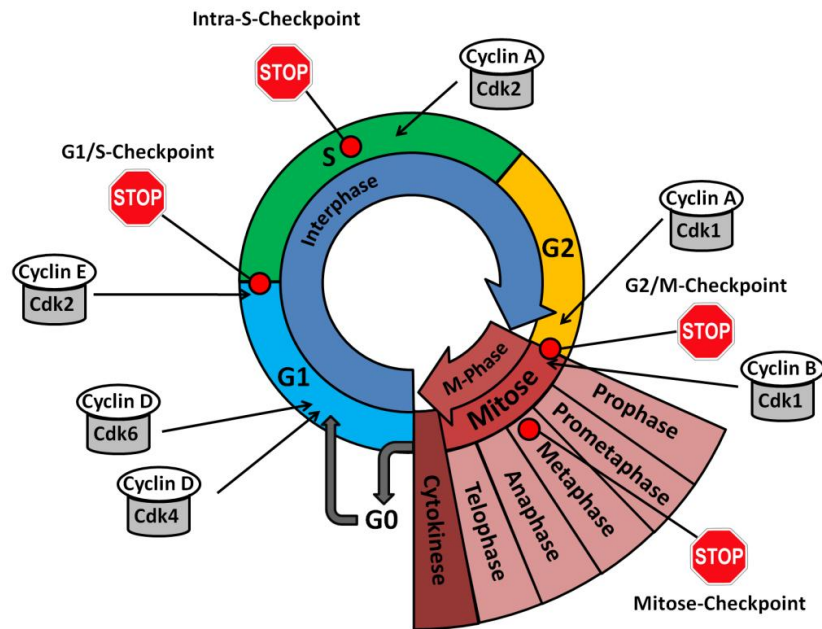


Abbildung 6: Der eukaryontische Zellzyklus und seine Checkpoints

Der eukaryontische Zellzyklus setzt sich aus der Interphase und der Mitosephase (M-Phase) zusammen. Die Interphase ist weiter in zwei Wachstumsphasen, G1- und G2-Phase, und eine DNA-Synthesephase (S-Phase) unterteilt. Während in der G1-Phase die Vorbereitung der Zelle auf die DNA-Replikation in der S-Phase erfolgt, wird die Zelle in der G2-Phase auf die M-Phase vorbereitet. Diese umfasst die Mitose und die Cytokinese, in der die Schwesterchromatiden und das Cytoplasma auf die beiden Tochterzellen aufgetrennt werden. Nach einer abgeschlossenen Zellteilung kann die Zelle den Zellzyklus verlassen und für unbestimmte Zeit in eine Art Ruhephase (G0-Phase) eintreten. Ebenso kann die Zelle aus der G0-Phase wieder in den Zellzyklus eintreten und sich erneut teilen. Die Progression der Zelle durch die einzelnen Phasen des Zellzyklus wird durch die Interaktion verschiedener Cycline und Cyclin-abhängiger Kinasen (Cdks) streng reguliert. Um eine fehlerfreie Zellteilung gewährleisten zu können, verfügt die Zelle über Kontrollpunkte (Checkpoints), die über den Zellzyklus zeitlich verteilt sind und durch ihre Aktivierung zu Verzögerungen bzw. Unterbrechungen des Zellzyklus führen. Dadurch wird der Zelle mehr Zeit für die Behebung von möglichen DNA-Schäden oder zur Synthese essentieller Proteine für die folgende Zellzyklusphase gewährt.

2.2.2 Zellzyklus-Checkpoints

Innerhalb des Zellzyklus verfügt die eukaryontische Zelle über mehrere zeitlich versetzte Checkpoints (Abbildung 6). Diese erlauben es, die Progression innerhalb des Zellzyklus zu bestimmten Zeiten auf Einzelzellebene anzuhalten, um der Zelle mehr Zeit für die Reparatur der Schäden zu geben. Die Checkpoints verhindern nicht nur das Mitführen von DSBs in sensible Zellzyklusphasen, sondern stellen ebenso die Vollständigkeit der DNA-Replikation sowie eine ausreichende Synthese der für die nächste Zellzyklusphase essentiellen Proteine und Organellen sicher. Dies wird jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht näher verfolgt. Nach abgeschlossener DSB-Reparatur wird der Checkpoint wieder aufgehoben und die Zelle in die nächste Zellzyklusphase entlassen. Je nach Ausmaß der Schädigung kann die Zellzyklusunterbrechung bis auf unbestimmte Zeit ausgedehnt werden. Nach der Exposition von eukaryontischen Zellen mit ionisierender Strahlung konnte gezeigt werden, dass die

Dauer des jeweils aktivierten Checkpoints nicht nur von der Menge der induzierten DSBs, welche sich proportional zur verabreichten Strahlendosis verhält, sondern auch von der spezifischen Reparaturkapazität des jeweiligen Zelltyps abhängt (Krempler et al. 2007; Deckbar et al. 2007). Der spät einsetzende, sensitive G1/S-Checkpoint hält G1-Phasezellen mit DNA-Schäden vom Übergang in die S-Phase zurück, wodurch die Replikation der geschädigten DNA verhindert wird. Treten während der S-Phase im Zuge der DNA-Synthese oder durch exogene Einflüsse dennoch DNA-Schäden auf, wird durch die Aktivierung des Intra-S-Checkpoints die Progression der Zelle durch die S-Phase verzögert und ihr dadurch mehr Zeit für die Reparatur der Schäden gegeben. Der Mitose-Checkpoint, der auch Spindel-Assemblierungs-Checkpoint (SAC) genannt wird, kontrolliert während der Mitose die exakte Bindung der Spindelfaser an die Kinetochore der Chromatiden und stellt dadurch eine korrekte Trennung der Schwesterchromatiden während der Anaphase sicher. Fehlerhafte und unvollständige Verknüpfungen aktivieren den Mitose-Checkpoint, der dadurch die Segregation der Schwesterchromatiden unterbindet und somit die genomische Integrität der Tochterzellen bewahrt bzw. vor einer möglichen Aneuploidie schützt.

2.2.2.1 Der G2/M-Checkpoint

Mit der Aktivierung des G2/M-Checkpoints wird der Eintritt von geschädigten G2-Phasezellen in die Mitose verhindert. Der G2-Phasearrest kann über zwei Prozesse mit unterschiedlichen Kinetiken erfolgen. Während durch eine Kombination aus kurzzeitigen, posttranslationalen Modifikationen verschiedener Effektorproteine eine schnelle, p53-unabhängige G2/M-Checkpointaktivierung eingeleitet wird, erreicht der langsamere Prozess den G2-Arrest über einen längeren Zeitraum hinweg durch eine p53-vermittelte Änderung des Transkriptionsverhalten der Zelle (Lukas et al. 2004). Dabei spielt der Cdk1/Cyclin B-Komplex mit seinen Mitose-fördernden Eigenschaften als primäres Ziel für den G2-Checkpoint eine entscheidende Rolle. Um einer gesunden Zelle den Eintritt in die Mitose zu ermöglichen, muss der durch die Bindung von Cyclin B an Cdk1 gebildete *mitosis-promoting factor* (MPF) zusätzlich noch aktiviert werden. Dies geschieht durch eine Dephosphorylierung am Threonin 14 und Tyrosin 15 der Cdk1-Untereinheit des MPFs durch die Phosphatase Cdc25c (Gabrielli et al. 1996). Treten in einer G2-Phasezelle DNA-Schäden (z.B. DSBs) oder unvollständig replizierte Bereiche im Genom auf, so wird die aktivierende Dephosphorylierung des Cdk1/Cyclin B-Komplexes verhindert. Bei dem schnellen, p53-unabhängigen Signalweg werden dabei im Zuge der DNA-Schadensantwort zunächst die Serin/Threonin-Proteinkinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia*

telangiectasia and Rad3-related protein) aktiviert. Während die Aktivierung von ATM durch DSBs erfolgt, wird ATR durch einzelsträngige und resektierte Bereiche aktiviert. ATM und ATR phosphorylieren anschließend die Serin/Threonin-Proteinkinasen Chk1 und Chk2, welche ihrerseits Cdc25c am Serin 216 phosphorylieren und somit den Proteinen der 14-3-3-Proteinfamilie eine Bindung an Cdc25c während der G2-Phase ermöglichen (Peng et al. 1997; Furnari et al. 1997). Dies fördert den Export von Cdc25c aus dem Zellkern in das Cytoplasma und verhindert damit deren Interaktion mit Cdk1 zum Zeitpunkt des G2/M-Phasenübergangs, wodurch der Cdk1/Cyclin B-Komplex inaktiv bleibt und die Initiation der Mitose unterbunden wird (Dalal et al. 1999).

Bei der noch nicht vollständig erforschten, langsameren, p53-abhängigen Aktivierung des G2/M-Checkpoints erfolgt der Arrest über eine Inhibierung des Cdk1/Cyclin B-Komplexes (Lukas et al. 2004). Nach der Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 durch ATM und ATR erfolgt eine p53-vermittelte Expression des Cdk-Inhibitors 1 (p21), sowie des *growth arrest and DNA-damage-inducible protein* (Gadd45), welche anschließend eine inhibierende Wirkung auf den Cdk1/Cyclin B-Komplex ausüben und somit den Eintritt in die Mitose verhindern (Taylor und Stark 2001; Bruno et al. 2006).

Obwohl der G2/M-Checkpoint G2-Phasezellen mit unreparierten DNA-Schäden vom Eintritt in die Mitose zurückhalten soll, konnte nachgewiesen werden, dass der G2/M-Checkpoint bereits aufgehoben wird, bevor die DSB-Reparatur vollständig abgeschlossen ist (Deckbar et al. 2007; Krempler et al. 2007). In den darauffolgenden Phasen der Mitose weisen diese Zellen etwa 10 - 20 DSBs auf. Die genauen Hintergründe sind noch nicht erforscht. Ersten Untersuchungen zufolge werden strahleninduzierte, lang persistierende DSBs vorrangig über den Mechanismus der homologen Rekombination (HR) repariert (Beucher et al. 2009). Es wäre möglich, dass im Zuge des Prozesses der HR mögliche resektierte, einzelsträngige Bereiche, sowie mögliche intermediäre Reparaturstrukturen kein aktives Signal für die Aufrechterhaltung des G2/M-Checkpoints mehr liefern. Darüber hinaus könnte generell auch die von 10 - 20 DSBs ausgehende Signalstärke für eine Wahrung des G2/M-Checkpoints zu schwach sein.

2.3 DNA-Reparatur

Um ihre genomische Integrität bewahren zu können, verfügt die eukaryontische Zelle über eine Reihe von unterschiedlichen Reparaturmechanismen. Basenschäden und Einzelstrangschäden können beispielsweise über die Mechanismen der Basenexzisionsreparatur (BER), die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) oder die Mismatch-Reparatur

behaben werden, Tymidin-Dimere über NER. Für die Reparatur von DSBs, existieren im Wesentlichen zwei Reparaturwege, die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ - *non-homologous end-joining*) und die homologe Rekombination (HR), die in den folgenden Kapiteln ausführlicher beschrieben werden.

2.3.1 DNA-Doppelstrangbruchreparatur

Der DSB zählt zu der schwerwiegendsten Form von DNA-Läsionen. DSBs können endogen durch freie Radikale induziert werden, die während den natürlichen Stoffwechselprozessen der Zelle freigesetzt werden. Zudem können DSBs als Folge von Replikationsstress entstehen. Desweiteren setzt Spo11 (*Spo11 meiotic protein covalently bound to DSB*) bei der Meiose gezielt DSBs, um durch die anschließende Rekombination eine genetische Vielfalt zu erreichen (Keeney et al. 1997). Ebenso werden bei der Immunglobulinsynthese im Zuge der V(D)J-Rekombination durch RAGs (*recombination activating genes*) gezielt DSBs gesetzt, um in Verbindung mit der darauffolgenden Rekombination die Variabilität der Antigen-Rezeptoren zu erhöhen (Fugmann et al. 2000). Exogen können die Behandlung von Zellen mit Chemikalien oder die Wechselwirkung mit ionisierender Strahlung zu DSBs führen.

2.3.1.1 DSB-Erkennung und -markierung

Vor der DSB-Reparatur steht die Erkennung des DSB durch den MRE11/Rad50/NBS1-Komplex (MRN-Komplex) (Rupnik et al. 2008). Der MRN-Komplex setzt sich aus den Proteinen Mre11 (*meiotic recombination 11*), Rad50 (*radiation 50*) und NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome*) zusammen (D'Amours und Jackson 2002). Nach der Identifizierung eines DSB binden die Komplexe über die Mre11-Untereinheit an die beiden jeweiligen DSB-Enden, welche durch die Rad50-Untereinheiten zusammengehalten werden (Abbildung 7) (Jager et al. 2001; Uziel et al. 2003). Desweiteren rekrutiert der MRN-Komplex mit seiner NBS1-Untereinheit die Serin/Threonin-Proteinkinase ATM, eine Kinase der PIKK-Familie (*phosphoinositide 3-kinase related protein kinase*), die eine entscheidende Rolle bei der Schadensmarkierung spielt, zur DSB-Region (Stucki und Jackson 2006). Die Aktivierung von ATM erfolgt zum einen durch die MRN-vermittelte Dissoziation der inaktiven ATM-Dimere in aktive ATM-Monomere, zum anderen durch die Autophosphorylierung von ATM (Lee und Paull 2005; Bakkenist und Kastan 2003). Nach der Aktivierung phosphoryliert ATM seinerseits weitere Proteine, die an der DNA-Schadensantwort, also an der DNA-Reparatur, an der Checkpointaktivierung und an der Apoptose beteiligt sind. Eine zentrale Rolle spielt dabei

die Phosphorylierung des Histons 2AX. Hierbei handelt es sich um eine Unterfamilie der H2A-Histone, die in Säugetieren etwa 2 - 25 % der H2A-Histone ausmacht. Die H2AX-Histonvariante weist am C-terminalen Ende eine Verlängerung mit einem Serin an der Position 139 auf, welches im Falle eines DSBs in der näheren Umgebung primär durch ATM phosphoryliert, und dadurch zum sog. γ H2AX wird (Rogakou et al. 1998; Burma 2001; Stucki und Jackson 2006). Neben der initialen Phosphorylierung der H2AX-Histone durch ATM erfolgen zu einem späteren Zeitpunkt weitere γ H2AX-Signalverstärkungen durch die Kinase ATR. ATR wird durch RPA-beladene (RPA = *replication protein A*), einzelsträngige DNA-Bereiche aktiviert, wie sie bei der Resektion im Zuge der Reparatur über den Weg der HR auftreten, und phosphoryliert daraufhin weitere H2AX-Histone. Das phosphorylierte Histon 2AX (γ H2AX) dient als wichtiges Signal für die Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren zum DSB. Durch die Bindung des Mediatorproteins MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) an γ H2AX können sich weitere MRN-Komplexe an MDC1 anlagern, welche wiederum weitere ATM-Proteine zu der DSB-Region rekrutieren, die die H2AX-Histone in der unmittelbaren Umgebung phosphorylieren (Lukas et al. 2011b). Ausgehend von der Bruchstelle, führt dies zu einer bidirektionalen Ausbreitung des γ H2AX-Schadensignals über einen Bereich von mehreren Megabasen auf dem Chromosom und somit zu einer Signalverstärkung.

Neben der ATM- und ATR-abhängigen Phosphorylierung können die H2AX-Histone noch über einen weiteren Mechanismus phosphoryliert werden. Im Zuge der DSB-Reparatur über den Mechanismus des NHEJ werden zu Beginn die DSB-Enden durch Ku70/Ku80-Heterodimere (*ATP-dependent DNA helicase 2 subunit KU70/80*) gebunden (Spagnolo et al. 2006). Diese rekrutieren die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PKcs) zur DSB-Stelle, welche anschließend ebenfalls die umliegenden H2AX-Histone phosphoryliert.

Nach der Phosphorylierung der H2AX-Histone kommt es im Zuge der DNA-Schadensantwort noch zu weiteren posttranslationalen Modifikationen der Nukleosomen. Die Histone 2A und 2AX werden dabei von den Ligasen RNF8, RNF168 (*ring finger protein 8/168*) und RING1B/BMI1 ubiquitiniert und ermöglichen dadurch die Bindung des Bindeproteins 53BP1 (*p53 binding protein 1*) und des Tumorsuppressorproteins BRCA1 (*breast cancer susceptibility gene 1*) an das Chromatin (Fradet-Turcotte et al. 2013; Mattioli et al. 2012; Gatti et al. 2012; Ismail et al. 2010; Mailand et al. 2007; Leung et al. 2014). 53BP1 und BRCA1 spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der weiteren DSB-Prozessierung. Während 53BP1 die Resektion der DNA-Enden unterdrückt und somit die Reparatur des DSBs über das NHEJ

begünstigt, fördert BRCA1 die Reparatur über den Weg der HR (Noon und Goodarzi 2011; Li und Greenberg 2012).

Mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen γ H2AX lassen sich die Bereiche mit den phosphorylierten H2AX-Histonen um die DSBs anfärben und unter dem Immunfluoreszenzmikroskop als sogenannte Foci detektieren. Dies bietet die Möglichkeit, sowohl die Induktion von DSBs als auch deren Reparatur auf Einzelzellebene genauer erforschen zu können (Löbrich et al. 2010).

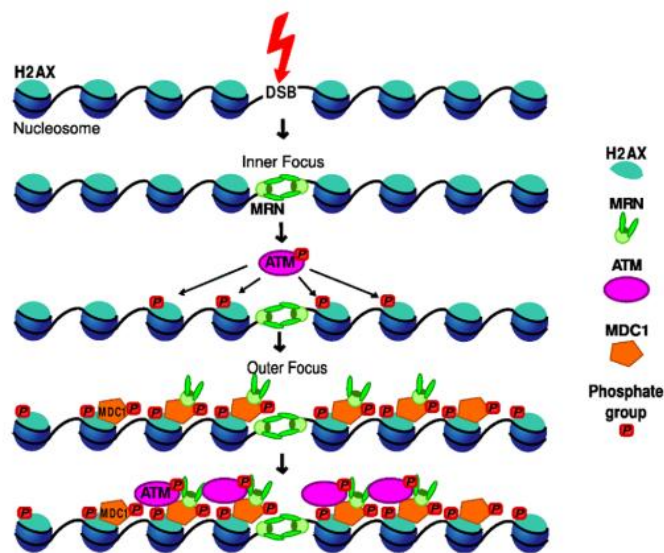


Abbildung 7: Die MRN-abhängige DSB-Erkennung und die daran beteiligten Faktoren. Nach der Induktion eines DSBs werden die Bruchenden durch den MRN-Komplex erkannt und gebunden. Dieser rekrutiert die Kinase ATM zum DSB, welche anschließend nach ihrer Aktivierung die Histone H2AX phosphoryliert. Dadurch wird die Anlagerung des Mediatorproteins MDC1 ermöglicht, welches wiederum weitere ATM-Kinasen rekrutiert. Auf diese Weise erfolgt eine bidirektionale Ausbreitung des γ H2AX-Schadensignals über einen Bereich von mehreren Megabasen hinweg. (Abbildung nach Tobias et al. 2013).

2.3.1.2 Auswahl des geeigneten DSB-Reparaturmechanismus

Im Wesentlichen verfügt die eukaryontische Zelle für die Reparatur von DSBs mit dem NHEJ und der HR über zwei unterschiedliche Hauptreparaturmechanismen. Für eine effiziente DSB-Reparatur ist die Wahl des geeigneten Reparaturweges von großer Bedeutung, jedoch ist noch nicht vollständig aufgeklärt, welcher genaue Mechanismus der Wahl zwischen NHEJ und HR zugrunde liegt. Aktuell werden dbzgl. zwei unterschiedliche Theorien in der Literatur verfolgt. Nach dem ersten Modell hängt die Wahl des geeigneten Reparaturweges maßgeblich von zwei Faktoren ab, nämlich von der Zellzyklusphase und dem Resektionsstatus der DSB-Enden (Sun et al. 2012). Während die HR für die Reparatur der DSBs homologe Sequenzen benötigt und nur in G2- und S-Phasezellen auf ein identisches Schwesterchromatid als Template zurückgreifen kann, ist das NHEJ unabhängig von Homologien und in jeder Zellzyklusphase die Hauptreparaturkomponente für strahleninduzierte DSBs (Wang et al. 2001; Iliakis 1991). Nach der Erkennung des DSB und der Anlagerung des MRN-Komplexes initiiert die Mre11-Untereinheit die Resektion der Bruchenden und fördert dadurch die weitere Reparatur über den Prozess der HR (D'Amours und Jackson 2002; Rass et al. 2009; Rupnik et al. 2010).

Während resektierte Einzelstränge bis zu einer Länge von etwa 50 bp noch über den Mechanismus des alternativen NHEJ (alt-NHEJ) repariert werden können, ist eine Reparatur von DSBs mit länger resektierten Bereichen nur noch über den Prozess der HR möglich (Grabarz et al. 2012). Somit steigt die Wahrscheinlichkeit der HR mit zunehmender Länge der resektierten DSB-Enden. Durch eine frühe Bindung des Ku70/Ku80-Heterodimers an die DNA-Enden, wird die Resektion blockiert, weitere NHEJ-spezifische Faktoren zur Bruchstelle rekrutiert und dadurch die Reparatur über den Mechanismus des NHEJ gefördert (Sun et al. 2012; Shrivastav et al. 2008). Nach dem zweiten Modell wird die Entscheidung über den folgenden Reparaturweg bereits zu einem früheren Zeitpunkt und in Abhängigkeit der Zellzyklusphase getroffen. Demnach wird nicht jeder DSB zuerst vom MRN-Komplex gebunden. Stattdessen werden sowohl der MRN-Komplex als auch das NHEJ-spezifische Ku70/Ku80-Heterodimer gleichzeitig und unabhängig voneinander zum DSB rekrutiert (Wu et al. 2008; Mimitou und Symington 2010; Shim et al. 2010; Thompson 2012). Dabei ist aktuell noch unklar, ob die beiden Komplexe, besonders in Hinblick auf die S- und G2-Phase, um die initiale Bindung an die DSB-Regionen konkurrieren, oder ein koordiniertes Zusammenspiel stattfindet (Grabarz et al. 2012). Neuste Studien legen nahe, dass beide Faktoren innerhalb weniger Sekunden nach der Schadensinduktion an die DSB-Enden binden, wobei sich das Ku70/Ku80-Heterodimer wenige Augenblicke früher als der MRN-Komplex anlagert (Hartlerode et al. 2015). Während die Bindung der Bruchenden durch den MRN-Komplex die Resektion und somit die anschließende Reparatur über die HR initiiert, leitet die Anlagerung des Ku70/Ku80-Heterodimers die Reparatur über das NHEJ ein. In Abwesenheit des MRN-Komplexes wird die dadurch ausbleibende Rekrutierung und Aktivierung von ATM durch die Aktivität der NHEJ-spezifischen DNA-PKcs teilweise kompensiert.

Die Tatsache, dass MRN-Foci bereits kurz nach Bestrahlung in allen Zellzyklusphasen nachweisbar sind (Polo und Jackson 2011), als auch die Ergebnisse neuerer Forschungsarbeiten, die zeigen, dass eine Inhibierung der MRE11-Endonukleaseaktivität des MRN-Komplexes die Reparatur über das NHEJ fördert (Shibata et al. 2014), bekräftigen jedoch das erste Modell der Wahl des DSB-Reparaturweges in Abhängigkeit vom Resektionsstatus der Bruchenden.

Neben der Zellzyklusphase und der Prozessierung der DSB-Enden beeinflussen aber auch Chromatinmodifikationen die Wahl des Reparaturmechanismus (Grabarz et al. 2012). Während der Erkennung und der Reparatur von DSBs kann es zu posttranslationalen Modifikationen der Histone in Form von Phosphorylierungen, Methylierungen, Ubiquitinierungen, Acetylierungen und Deacetylierungen sowie zu Veränderung der Nukleosomenanordnung durch die sog. Chromatin-Remodellierungskomplexe kommen

(House et al. 2014; Bao 2011). Je nach Art der Modifikation können unterschiedliche Prozesse wie die Relaxation des Chromatins oder die Rekrutierung von NHEJ- bzw. HR-spezifischen Reparaturfaktoren gefördert und somit der jeweilige Reparaturmechanismus begünstigt werden. Wie bereits in Kapitel 2.3.1.1 erläutert, kann beispielsweise die Bindung von 53BP1 an die phosphorylierte Histonvariante γ H2AX die Resektion der Bruchenden inhibieren und dadurch die Reparatur über das NHEJ begünstigen, während eine Anlagerung von BRCA1 die HR fördert (Noon und Goodarzi 2011; Li und Greenberg 2012). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl die Komplexität des DNA-Schadens als auch die Komplexität des Chromatins einen Einfluss auf die Wahl des DSB-Reparaturweges haben (Shibata et al. 2011). DSBs, die durch Strahlungstypen mit einem hohen LET oder in Bereichen des Heterochromatins induziert wurden, werden mit einer höheren Wahrscheinlichkeit über die HR prozessiert. Dagegen erfolgt die Reparatur von DSBs, die durch Strahlungstypen mit geringerem LET oder im Bereich des Euchromatin auftreten, vermehrt über die schnelle Reparaturkomponente des NHEJ.

2.3.1.3 Die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ)

In eukaryontischen Zellen repräsentiert das NHEJ bei der Reparatur von DSBs die schnelle Hauptreparaturkomponente und repariert etwa 85 % der durch Röntgenstrahlung induzierten DSBs (Wang et al. 2001; Iliakis 1991; Beucher et al. 2009). Im Gegensatz zu dem langsamen, alternativen Reparaturmechanismus der HR benötigt sie für die DSB-Reparatur keine homologen Sequenzen und kann somit in jeder Zellzyklusphase agieren. Bei dem Prozess des NHEJ werden freie Bruchenden unabhängig von ihrer Sequenz miteinander ligiert, was unter Umständen zu einer Fehlverknüpfung bzw. zu Translokationen führen kann (Lieber 2010; Simsek et al. 2011). Bei komplexen Brüchen bedarf es vor der Verknüpfung einer kurzen Prozessierung der Bruchenden, wodurch es zum Verlust von wichtiger, genetischer Information kommen kann. Aus diesen Gründen gilt das NHEJ als fehlerlastig.

Innerhalb des NHEJ unterscheidet man zwischen dem kanonischen NHEJ (c-NHEJ) und dem alternativen NHEJ (alt-NHEJ). Bei dem klassischen c-NHEJ lagert sich das Ku70/Ku80-Heterodimer nach der Schadensinduktion über eine Ringstruktur sequenzunspezifisch an die DSB-Enden an, wodurch die Resektion der Bruchenden blockiert wird (Abbildung 8) (Dylan und Yoo 1998; Walker et al. 2001; Uematsu et al. 2007; Sun et al. 2012). Nach der Bindung an die DNA fungiert der DNA-Ku70/Ku80-Komplex als Plattform für die Anlagerung weiterer NHEJ-spezifischer Faktoren (Weterings und Chen 2007). Unter anderem rekrutiert das Ku70/Ku80-Heterodimer die katalytische Untereinheit DNA-PKcs zur Bruchstelle und

ermöglicht dadurch die Bildung des aktiven DNA-PK-Holoenzym (DNA-abhängige Protein Kinase), bestehend aus zwei Ku70/Ku80-Heterodimeren und zwei DNA-PKcs. Kernaufgaben der DNA-PKcs sind die Positionierung zweier DSB-Enden in räumlicher Nähe zueinander sowie die Rekrutierung weiterer NHEJ-Faktoren, die an der Prozessierung und der Ligation der DSB-Enden beteiligt sind (Panier und Boulton 2013). Darunter befinden sich mit dem *X-Ray repair cross-complementing protein 4/XRCC4-like factor*-Komplex (XRCC4-XLF-Komplex) noch weitere Proteine, die ebenfalls am Zusammenhalt der beiden Bruchenden beteiligt sind (Andres et al. 2012). Die Bindung weiterer Faktoren an die Bruchenden wird durch eine *trans* Autophosphorylierung der DNA-PK ermöglicht (Meek et al. 2007). Induziert durch die Bildung des Holoenzym, führt die Autophosphorylierung der DNA-PK zu einer Konformationsänderung des Holoenzym, welches die DSB-Enden wieder freilegt und damit für weitere NHEJ-Faktoren einen direkten Zugang zu der DNA der Bruchenden ermöglicht (Meek et al. 2007; Weterings und Chen 2007).

Nicht alle gebrochenen DNA-Moleküle können ohne eine kurze Prozessierung der DSB-Enden miteinander verbunden werden. Beispielsweise hindern einzelsträngige Überhänge, komplexe Basenschäden oder das Fehlen der für die Ligation benötigten 3'-OH- oder 5'-P-Enden die direkte Verknüpfung der beiden Bruchenden. Mit Hilfe der zum DSB rekrutierten Endonuklease Artemis werden die einzelsträngigen Überhänge abgebaut (Ma et al. 2002). Fehlende Nukleotide werden durch die Polymerasen μ und λ hinzugefügt (Ma et al. 2002; Weterings und Chen 2007).

Nachdem die Prozessierung der DSB-Enden abgeschlossen ist, erfolgt die Ligation der beiden DNA-Moleküle durch den DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex in Zusammenarbeit mit XLF (Panier und Boulton 2013; Lieber 2010).

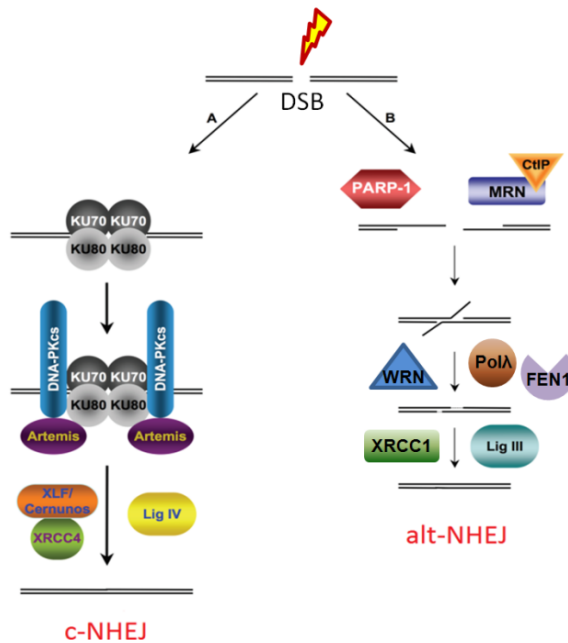


Abbildung 8: Mechanismus des NHEJ

(A) Bei dem Prozess des kanonischen NHEJ (c-NHEJ) wird der DSB durch Ku70/Ku80 gebunden, wodurch die Resektion der Bruchenden inhibiert wird. Ku70/Ku80 rekrutiert die katalytische Untereinheit DNA-PKcs und bildet dadurch das DNA-PK-Holoenzym. DNA-PKcs richtet die beiden Bruchenden zueinander aus und ermöglicht die Bindung weiterer NHEJ-spezifischer Faktoren wie die Nuklease Artemis und den Ligase IV-Komplex (Lig IV/XRCC4/XLF). Mögliche einzelsträngige Überhänge werden von Artemis abgebaut und die DSB-Enden durch den Ligase IV-Komplex ligiert.

(B) Beim alternativen NHEJ (alt-NHEJ) wird der DSB durch PARP1 und den MRN-Komplex gebunden und wie bei der HR die initiale Resektion der Bruchenden eingeleitet. Dabei freigelegte Mikrohomologien annealen miteinander und können zu einzelsträngigen Überhängen und einzelsträngigen Bereichen führen. Diese werden durch die Endonuklease FEN1, die Helikase WRN und die Polymerase λ (Polλ) prozessiert und anschließend durch den XRCC1/Ligase III-Komplex ligiert.

Beim NHEJ kann es zu Deletionen, sowie zu Verknüpfung falscher Bruchenden kommen.

(Abbildung verändert nach Grabarz et al. 2012)

In Ku70/Ku80-defizienten Zellen (c-NHEJ-Mutanten) kann die Reparatur von DSBs nicht mehr über das c-NHEJ stattfinden. Stattdessen erfolgt die Prozessierung der DSBs über den Mechanismus des alternativen NHEJ (alt-NHEJ). Dabei werden die DSB-Enden durch die ausbleibende Anlagerung des Ku70/Ku80-Heterodimers nicht mehr vor der Resektion geschützt und von dem MRN-Komplex sowie von der Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP1) erkannt und gebunden. PARP1 konkurriert mit dem Ku70/Ku80-Heterodimer um die Bindung an die DNA im Bereich des DSBs und fördert nach eigener Anlagerung das alt-NHEJ (Robert et al. 2009; Wang et al. 2006). Aufgrund seiner wesentlich geringeren Bindungsaffinität als Ku70/Ku80 ist jedoch eine Anlagerung an die DNA nahezu ausschließlich nur in Ku70/Ku80-defizienten möglich. In Folge der Bindung beginnt die initiale Resektion der DSB-Enden durch die Exonukleaseaktivität der Mre11-Untereinheit des MRN-Komplexes mit CtIP (*C-terminal binding protein interacting protein*) und formt einzelsträngige Bereiche mit Mikro-Homologien von wenigen Basenpaaren (2 - 8 bp) (Frit et al. 2014; Grabarz et al. 2012; Mansour et al. 2010). Jüngere Forschungsarbeiten konnten belegen, dass dabei CtIP durch die Serin/Threonin-Proteinkinase Plk3 (*polo-like kinase 3*) aktiviert wird (Barton et al. 2014). Anschließend kommt es zum Annealing der Micro-Homologien der getrennten DNA-Moleküle. Dabei kann es zur Ausbildung von intermediären Verzweigungsstrukturen (*branched structures*) kommen, deren spätere Auflösung zu Deletionen und damit zum Verlust von genetischer Information führt. Mit Hilfe weiterer am alt-NHEJ beteiligten Faktoren, wie der

Polynukleotid-Kinase (PNK), der *Flap*-Endonuklease 1 (FEN1), der Helikase WRN (*Werner syndrome ATP-dependent helicase*) und der Polymerase λ (Pol λ), werden die intermediären Strukturen prozessiert und die beiden DNA-Moleküle abschließend durch den *X-Ray repair cross-complementing protein 1*/Ligase 3-Komplex (XRCC1/Lig3-Komplex) miteinander ligiert (Sallmyr et al. 2008; Frit et al. 2014). Somit lassen sich auch Mre11-resektierte, einzelsträngige Bereiche mit einer maximalen Länge von bis zu 50 bp über den Mechanismus des alt-NHEJ reparieren (Grabarz et al. 2012). Die Ergebnisse neuerer Studien lassen darauf schließen, dass in der G1-Phase das alt-NHEJ der vermeindlich letztmögliche Reparaturmechanismus ist, um die DSBs vor dem Eintritt in die darauffolgende S-Phase zu reparieren (Barton et al. 2014). Jedoch steigt mit der Reparatur über diesen Prozess die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Translokationen. Darüber hinaus postuliert die Arbeit von Barton et al., dass in der G1-Phase die CtIP-abhängige Prozessierung der DSB-Enden nicht nur im Rahmen des alt-NHEJ in Ku70/Ku80-defizienten Zelllinien stattfindet, sondern auch in wt-Zellen nach der Induktion von komplexen DSBs erfolgt.

Neben dem eben beschriebenen Ligase 3-abhängigen Mechanismus des alt-NHEJ ist mit dem Ligase 1-abhängigen Prozess noch ein weiterer alt-NHEJ-Reparaturweg in der Literatur beschrieben, der zwar unabhängig von Mikro-Homologien agiert, jedoch nur als eine Art Backup-Mechanismus zum Ligase 3-abhängigen alt-NHEJ fungiert (Simsek et al. 2011).

2.3.1.4 Die homologe Rekombination (HR)

Die HR vertritt in eukaryontischen Zellen bei der Reparatur von DSBs die langsame Reparaturkomponente und repariert etwa 15 % der durch Röntgenstrahlung induzierten DSBs (Beucher et al. 2009; Wang et al. 2001; Iliakis 1991). Für die Rekonstruktion des gebrochenen DNA-Moleküls greift sie für die DNA-Synthese auf homologe Sequenzen des intakten Schwesterchromatids als Template zurück und gewährleistet dadurch im Gegensatz zum NHEJ eine fehlerfreie Reparatur. Die nötige Anwesenheit von homologen Sequenzen beschränkt jedoch gleichzeitig die Aktivität der HR auf die S- und G2-Phase innerhalb des Zellzyklus. Während der Mitose ist die DSB-Reparatur generell durch die Phosphorylierung des NHEJ-spezifischen Faktors 53BP1 und des HR-fördernden Faktors RNF8 inhibiert (Orthwein et al. 2014). Innerhalb der HR-abhängigen DSB-Reparatur unterscheidet man mit dem klassischen Doppel-Holliday-Junction-Modell (dHJ-Modell), dem *synthesis-dependent strand annealing* (SDSA) und der *break-induced replikation* (BIR) zwischen drei unterschiedlichen Mechanismen.

2.3.1.4.1 Das Doppel-Holliday-Junction-Modell (dHJ-Modell)

Bei dem klassischen dHJ-Modell lagert sich der MRN-Komplex nach der Erkennung des DSBs an die DNA im Bereich der Läsion an und leitet interagierend mit CtIP die initiale Resektion der DSB-Enden ein (Abbildung 9) (Sartori et al. 2007; D'Amours und Jackson 2002; Rass et al. 2009; Rupnik et al. 2010). Dabei setzt der MRN-Komplex mit der Endonukleasefunktion seiner Mre11-Untereinheit einen Einzelstrangbruch im Zucker-Phosphat-Rückgrat des 5'-DNA-Stranges nahe des DSBs und startet von dort mit seiner 3'-5'-Exonukleaseaktivität die Resektion in Richtung des DSBs. Hierbei wird zunächst nur ein kurzer Abschnitt von wenigen Basen (< 20 bp) freigelegt, durch den die Helikase BLM (Bloom-Syndrom-Protein) und die Exonuklease 1 (Exo1) rekrutiert werden (Truong et al. 2013). Ausgehend von dieser Stelle erfolgt unter Mithilfe der Helikasefunktion von BLM die weitere Resektion (*long-range DNA end resection*) von bis zu 3,5 kb durch einen bidirektionalen, nukleolytischen Abbau des 5'-DNA-Stranges durch die Nukleasen Mre11, Exo1 und Dna2 (*DNA replication nuclease 2*), wobei Mre11 zum DSB hin (3'-5'-Resektion) und Exo1 und Dna2 vom DSB weg (5'-3'-Resektion) resektieren (Zhu et al. 2008; Garcia et al. 2011; Zhou et al. 2014).

Während der fortschreitenden Resektion beginnt indes die Bildung des Nukleoproteinfilamentes, womit die Reparatur über den Mechanismus der HR unwiderruflich eingeleitet wird. Die durch die Resektion freigelegten, einzelsträngigen 3'-Überhänge werden unmittelbar von RPA gebunden, wodurch die Ausbildung von sekundären *hairpin*-Strukturen sowie die Degradation durch Nukleasen unterbunden wird und somit die weitere Prozessierung über den Mechanismus der HR gewährleistet werden kann (Fanning 2006). Im Anschluss kommt es zu einem Brca2-(*breast cancer susceptibility gene 2*)-vermittelten Austausch der RPA-Moleküle durch die Rekombinase Rad51 und damit zur Ausbildung des Rad51-Nukleoproteinfilamentes (Yang et al. 2005; Liu et al. 2010). Neben Brca2 sind auch die Rad51-Paraloge Rad51B, Rad51C, Rad51D, Xrcc2, Xrcc3 sowie Rad52 an der Rekrutierung der Rad51-Rekombinase am DSB beteiligt (Suwaki et al. 2011; Heyer et al. 2010). Das Rad51-Nukleoproteinfilament ermöglicht nun die Suche nach homologen Sequenzen auf dem genetisch identischen Schwesterchromatid, indem es die Stranginvasion des resektierten 3'-Überhangs in das intakte, homologe DNA-Molekül katalysiert (Sung 1994; Suwaki et al. 2011). Bei der Stranginvasion wird der 5'-3' Strang des intakten Schwesterchromatids durch den invadierenden 3'-Überhang des DSBs verdrängt. Das mobile Rad51-Nukleoproteinfilament gleitet anschließend mit hohen Geschwindigkeiten (8 kbp/s) über die DNA des Schwesterchromatids, scannt diese ab und findet eher zufällig als gerichtet die entsprechende homologe Sequenz (Ragunathan et al. 2012; Forget und Kowalczykowski

2012). Unterstützt durch die Interaktion von Rad54 mit Rad51 kommt es nach der Bindung der homologen Bereiche zur Ausbildung der sog. D-Loop-Struktur (*displacement loop*) (Solinger und Heyer 2001). Bevor die DNA-Synthese zur Wiederherstellung der durch den nukleolytischen Abbau der Bruchenden während der Resektion verlorengegangenen, genetischen Information starten kann, müssen nach abgeschlossener Homologiesuche die Rad51-Moleküle entfernt werden, um eine Anlagerung der Polymerase δ zu ermöglichen (Terasawa et al. 2007; Solinger et al. 2002). Dies wird ebenfalls durch Rad54 unter Beteiligung der Helikase HelQ ermöglicht (Ward et al. 2010). Im Anschluss erfolgt die DNA-Synthese durch die Polymerase δ , wobei man sich dabei aktuell eine unterstützende Wirkung durch weitere, noch nicht identifizierte Polymerasen vorstellt (Sneeden et al. 2013). Im Zuge der fortschreitenden Elogation des invadierenden 5'-3'-Stranges wird der D-Loop unter der Mithilfe von Rad54 verschoben und ausgedehnt (*branch migration*) (Ceballos und Heyer 2011). Die daraus resultierende Überkreuzung der Schwesterchromatiden wird als *Crossing-over*-Struktur oder (einfache) Holliday Junction bezeichnet (Holliday 2007). Im Gegensatz zum später beschriebenen, verwandten Mechanismus des *synthesis-dependent strand annealing* (SDSA) (Abschnitt 2.3.1.4.2) folgt bei der klassischen HR auf die Ausdehnung des D-Loops das *second-end capture*. Sofern es durch das zweite resektierte Bruchende zu einem weiteren, unabhängigen Stranginvasionsereignis in die Duplex-DNA des Schwesterchromatids kommt, erfolgt das *second-end capture* über einen Rad51-vermittelten Prozess (Nimonkar et al. 2009). Falls jedoch das erste Stranginvasionsereignis schneller abläuft und im Zuge der folgenden DNA-Synthese der invadierte Strang bereits über den Bereich der homologen Sequenz für das zweite resektierte Bruchende hinweg verlängert wurde, kann von dem zweiten 3'-Überhang keine weitere nutzbringende Stranginvasion mehr durchgeführt werden. Ausgehend von dem mit RPA- und Rad52-beladenen D-Loop kommt es in Folge dessen zu einem Rad52-vermittelten Einfangen des zweiten, ebenfalls mit Rad52-beladenen 3'-Überhanges. Durch die anschließend fortschreitende DNA-Synthese sowie der *branch migration* und der Ligation der neusynthetisierten DNA mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat des ursprünglichen DNA-Moleküls wird eine doppelte Holliday Junction (dHJ) ausgebildet (Holliday 2007; Nimonkar et al. 2009).

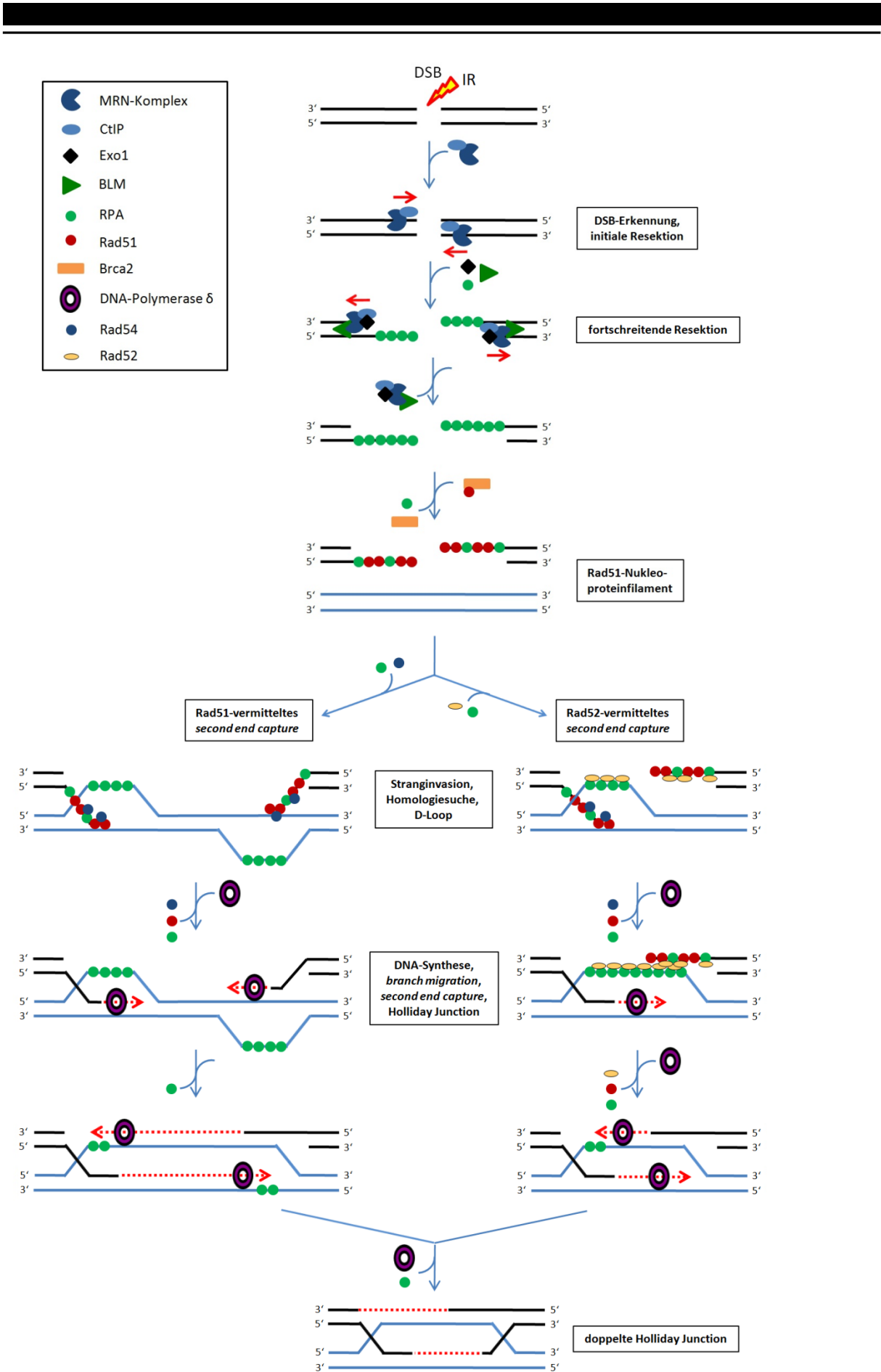


Abbildung 9: Mechanismus der klassischen HR (dHJ-Modell)

Nach der Induktion eines DSBs werden die Bruchenden durch den MRN-Komplex erkannt, gebunden und die initiale Resektion in Zusammenarbeit mit CtIP eingeleitet. Durch die Anlagerung der Exonuklease Exo1 an MRN beginnt unter Mithilfe der Helikase BLM die weitere Resektion in 5'-3'-Richtung. Die dabei freigelegten, einzelsträngigen Bereiche werden zunächst von RPA gebunden und anschließend über einen Brca2-vermittelten Prozess durch Rad51 ersetzt. Das dadurch gebildete Rad51-Nukleoproteinfilament führt die Homologiesuche durch, indem es das 3-Ende in die Duplex-DNA des homologen Schwesterchromatids führt und den 3'-5'-Strang nach Homologien abscannt. Unterstützt durch Rad54 bildet sich dabei der D-Loop aus, dessen einzelsträngige Bereiche unmittelbar von RPA gebunden werden. Nachdem die homologe Sequenz gefunden ist, katalysiert Rad54 die Entfernung der Rad51-Proteine vom invadierenden Strang und ermöglicht dadurch den Start der DNA-Synthese durch die Polymerase δ . Die dabei entstandene Überkreuzungsstruktur wird auch als einfache Holliday Junction (HJ) bezeichnet. Mit fortschreitender Elongation wird der D-Loop bzw. die einfache HJ verschoben (*branch migration*) und es kommt zum *second end capture*. Dies kann über einen Rad51-vermittelten oder Rad52-vermittelten Prozess erfolgen. Nachdem das zweite resektierte 3'-Bruchende an die entsprechenden Homologien des D-Loops gebunden hat, beginnt auch hier die DNA-Neusynthese durch die Polymerase δ . Im Zuge der fortschreitenden Elongation verbindet sich das invadierte 3'-Ende mit dem 5'-Ende des zweiten Bruchendes unter Ausbildung einer doppelten Holliday Junction (dHJ).

Nach abgeschlossener DNA-Synthese erfolgt die Auflösung der intermediären HR-Reparaturstrukturen wie HJ, dHJ oder den beim Prozess der BIR und dem SDSA auftretenden D-Loops. Hierbei spielen die Helikase BLM in Kombination mit der Topoisomerase III α (TopoIII α), sowie die Endonukleasen Mus81-Eme1 (Mus81), Slx1-Slx4 (Slx1), ERCC1-XPF (XPF) und Gen1 eine tragende Rolle und werden in Abschnitt 2.3.2 genauer beschrieben (Mimitou und Symington 2009; Matos et al. 2011; Sarbajna et al. 2014; Agostinho et al. 2013; Heyer 2004). In Abhängigkeit des Mechanismus der Auflösung und der Schnitorientierung der Nukleasen kann ein Austausch von homologen DNA-Abschnitten zwischen den beiden Schwesterchromatiden (*crossing over*) erfolgen. Die BLM/TopoIII α -katalysierte Auflösung von HR-Intermediaten wird als Dissolution bezeichnet und führt ausschließlich zu *Non-crossover*-Produkten. Dagegen wird die Nuklease-abhängige Auflösung Resolution genannt und generiert *Crossover*-Produkte. Während bei der Meiose das *crossing over* zwischen väterlichen und mütterlichen Chromosomen ein gewünschter Prozess zur Erhöhung der genetischen Vielfalt ist, kann ein *crossing over* zwischen Schwesterchromatiden in der Mitose zum Verlust der Heterozygotie und unter Umständen sogar zu Chromosomenaberrationen führen (Bugreev et al. 2007). Aus diesem Grund ist die Dissolution der bevorzugte Prozess. Die Auflösung der intermediären Reparaturstrukturen schließt die Reparatur über den Mechanismus der HR ab.

2.3.1.4.2 Synthesis-dependent strand annealing (SDSA)

Neben dem Modell der klassischen HR, bei der es zur Ausbildung einer dHJ kommt, kann die HR-abhängige DSB-Reparatur auch über den Mechanismus des *synthesis-dependent strand annealing* (SDSA) erfolgen (Heyer et al. 2010). Voraussetzung für diesen Reparatur-

mechanismus ist das Vorhandensein des zweiten Bruchendes (Heyer et al. 2010). Beim SDSA verläuft die Erkennung und die Prozessierung der DSBs bis einschließlich zur Ausbildung des D-Loops durch die Stranginvasion/Homologiesuche des Rad51-Nukleoproteinfilamentes identisch zum dHJ-Modell (Abbildung 9). Während es bei der klassischen HR zum *second end capture* und zur Ausbildung einer dHJ kommt, löst sich beim SDSA der invadierte 3'-Strang nach ausreichender Elongation vom Templatestrang und lagert sich an komplementäre Bereiche des zweiten Bruchendes an (Pâques und Haber 1999). Gleichzeitig bildet sich der D-Loop zurück. Für die weitere Verlängerung des resektierten Stranges dient nun der komplementäre Strang desselben Chromatids als Template. Da beim Prozess des SDSA keine dHJ ausgebildet werden, treten nach abgeschlossener Reparatur auch keine *Crossover*-Strukturen auf. Dies macht das SDSA zum bevorzugten Reparaturweg unter den HR-abhängigen Prozessen in somatischen Zellen (Heyer et al. 2010).

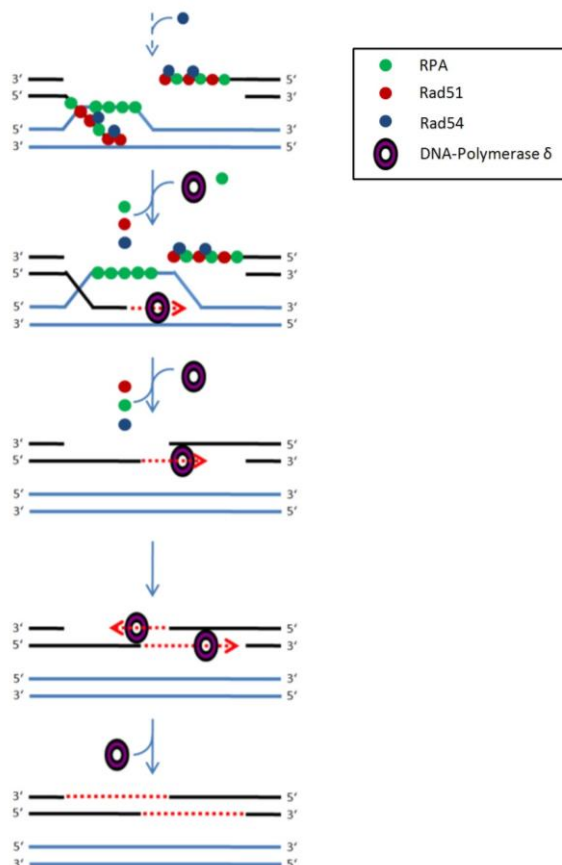


Abbildung 10: Mechanismus des SDSA

Die Erkennung des DSBs, die Resektion, sowie die Homologiesuche durch das Rad51-Nukleoproteinfilament und die Initiation der DNA-Synthese erfolgen beim SDSA analog zum dHJ-Modell (Abbildung 9). Jedoch kommt es beim SDSA nicht zum *second-end capture*. Stattdessen löst sich das invadierte 3'-Bruchende nach ausreichender Elongation vom Templatestrang, lagert sich an komplementäre Bereiche des 3'-5'-Stranges des zweiten Bruchendes an und setzt die DNA-Synthese fort. Der neusynthetisierte Strang dient dabei selbst als Template für die Elongation des zweiten resektierten 3'-Endes. Gleichzeitig bildet sich der D-Loop zurück.

2.3.1.4.3 Break-induced replication (BIR)

Der Prozess der *break-induced replication* (BIR) stellt die dritte Variante der HR-abhängigen DSB-Reparatur dar. Im Gegensatz zum dHJ- und SDSA-Modell erfolgt die Reparatur über den Prozess der BIR in Abwesenheit des zweiten Bruchendes (Heyer et al. 2010). Einendige DSBs können beispielsweise während der Replikation in der S-Phase entstehen. Analog zum dHJ- und SDSA-Modell wird das DSB-Ende bei der BIR zunächst resektiert und durch die Stranginvasion/Homologiesuche eine D-Loop-Struktur ausgebildet (Abbildung 9). Da jedoch kein zweites Bruchende vorliegt, findet kein *second-end capture* statt (Heyer et al. 2010). Die anschließende DNA-Synthese erfolgt anhand einer neu ausgebildeten, klassischen Replikationsgabel, wobei das Schwesterchromatid als Template für die DNA-Neusynthese der fehlenden Duplex-DNA des geschädigten Stranges hinter dem DSB dient (Lydeard et al. 2010). Zwar kann durch diesen Prozess die genomische Integrität des geschädigten Chromosomes sichergestellt werden, jedoch nur unter dem Verlust der Heterozygotie im Bereich hinter dem DSBs (Heyer et al. 2010).

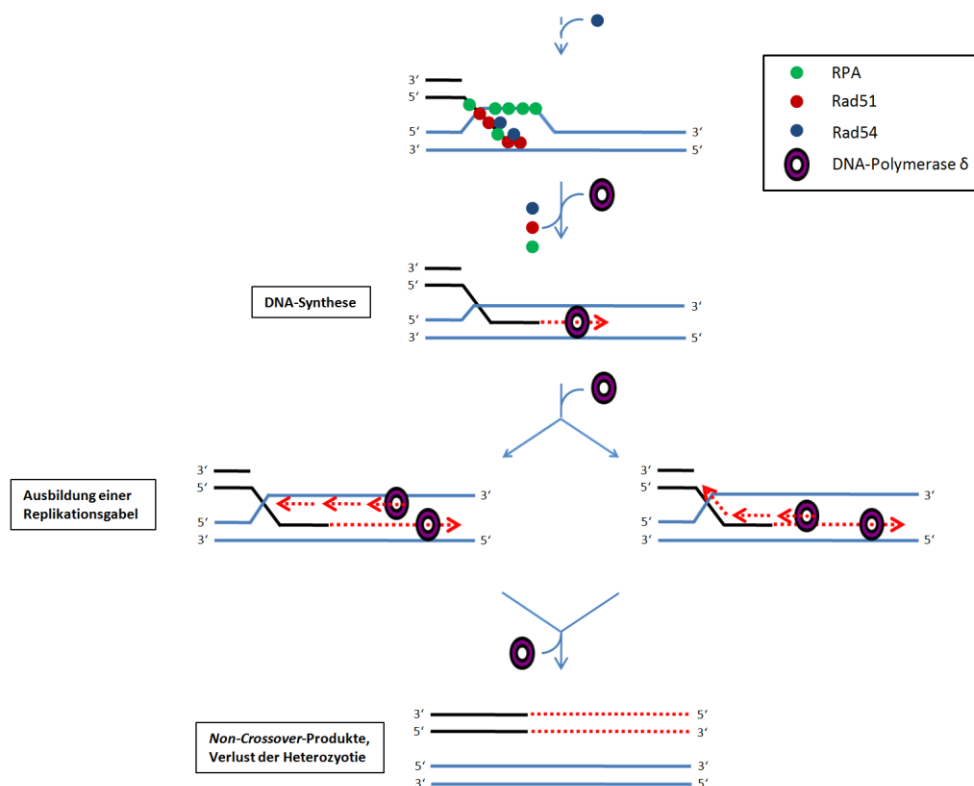


Abbildung 11: Mechanismus der BIR

Die Erkennung des einseitigen DSB, die Resektion sowie die Homologiesuche durch das Rad51-Nukleoproteinfilament und die Initiation der DNA-Synthese finden beim BIR analog zum dHJ-Modell der HR statt (Abbildung 9). Aufgrund des fehlenden zweiten Bruchendes kommt es jedoch nicht zum *second-end capture*. Die DNA-Neusynthese der fehlenden Duplex-DNA erfolgt anschließend anhand einer klassischen Replikationsgabel. Da jedoch für die DNA-Synthese beider Stränge der Duplex-DNA hinter dem DSB das Schwesterchromatid als Template dient, führt dies zum Verlust der Heterozygotie.

2.3.1.5 Single-strand annealing (SSA)

Ähnlich wie bei der HR ist die Reparatur über den Prozess des *single-strand annealing* (SSA) abhängig von Homologien. Im Gegensatz zur HR greift das SSA für die DNA-Synthese nicht auf das identische Schwesterchromatid als Template zurück, sondern nutzt repetitive Sequenzen innerhalb desselben DNA-Moleküls.

Analog zur HR wird der DSB nach der Schadensinduktion durch den MRN-Komplex erkannt und die Bruchenden in Zusammenarbeit mit CtIP, Exo1 und BLM resektiert (Abbildung 12). Die dadurch entstehenden, einzelsträngigen 3'-Überhänge werden von RPA gebunden und somit vor dem nukleolytischen Abbau geschützt. Sofern durch die fortlaufende Resektion zwei komplementäre, repetitive Sequenzen freigelegt werden, kann es zu einem Rad52-vermittelten Annealing zwischen den beiden Bereichen kommen (van Dyck et al. 2001). Da bei der Homologiesuche keine Stranginvasion in ein zweites DNA-Molekül stattfindet, ist dieser Mechanismus Rad51-unabhängig (Ceccaldi et al. 2016). Mögliche durch das Annealing entstehende Überhänge, sog. 3'-Flap-Strukturen, werden anschließend durch die Endonuklease ERCC1-XPF abgebaut (Al-Minawi et al. 2007). Dadurch kommt es zu Deletionen, die die Fehlerlastigkeit dieses Reparaturwegs begründen. Nach der Prozessierung der Überhänge werden die einzelsträngigen Lücken über die DNA-Neusynthese durch die Polymerase δ aufgefüllt und abschließend mittels Ligation durch den Ligase3/XRCC1-Komplex geschlossen (Symington 2002).

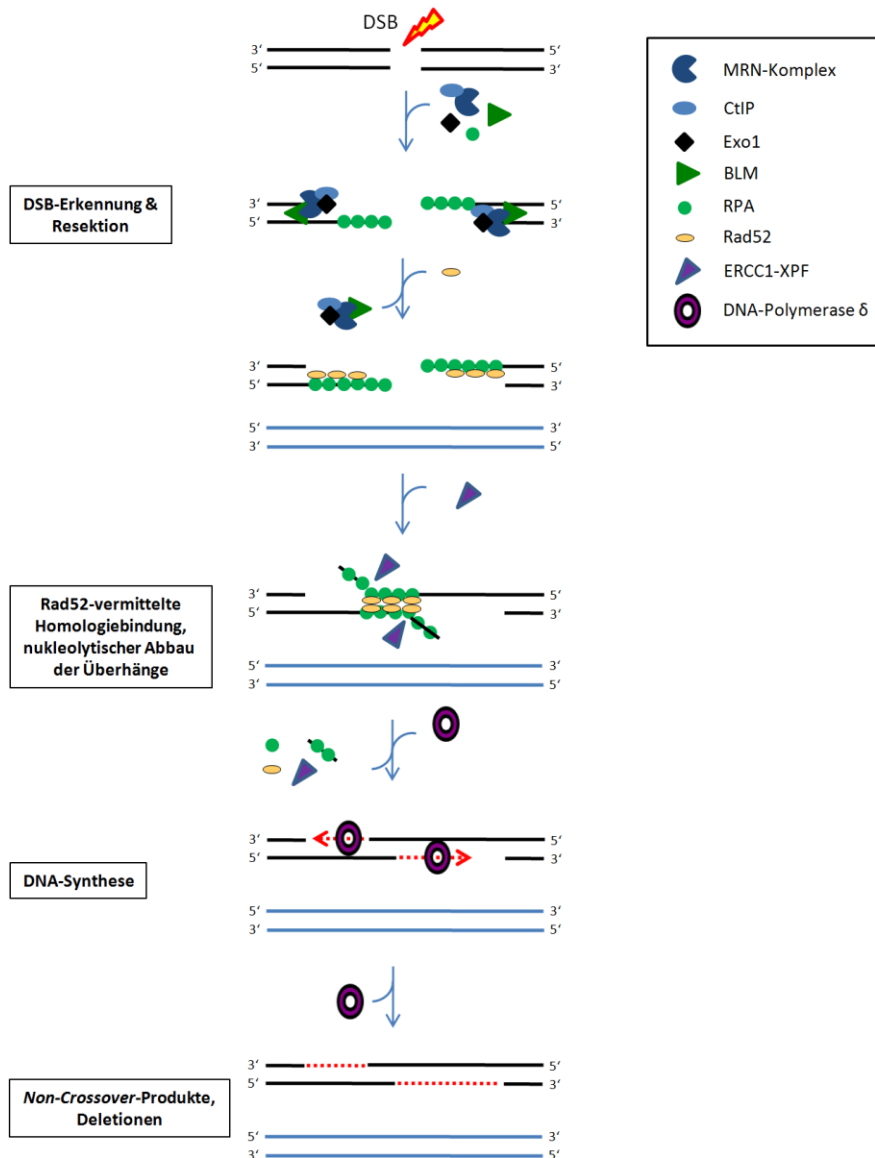


Abbildung 12: Mechanismus des SSA

Nach der zum dHJ-Modell der HR analogen Erkennung und Resektion der Bruchenden werden die einzelsträngigen 3'-Überhänge von RPA gebunden. Sofern durch die Resektion zwei zueinander komplementäre, repetitive Sequenzen freigelegt werden, kann es zu einer Rad52-vermittelten Anlagerung der beiden Einzelstränge kommen. Mögliche dabei entstehende 3'-Flap-Strukturen werden von der Endonuklease ERCC1-XPF abgebaut, wodurch es zu Deletionen kommt. Anschließend werden die Lücken mittels DNA-Synthese durch die Polymerase δ aufgefüllt und die Zucker-Phosphat-Rückgrate abschließend durch den Ligase3/XRCC1-Komplex miteinander verknüpft.

2.3.2 Auflösung von intermediären Reparaturstrukturen der HR

Wie bereits in Abschnitt 2.3.1.4.1 beschrieben, kommt es während der DSB-Reparatur über den Mechanismus der HR im Zuge der Homologiesuche und der DNA-Synthese zur Ausbildung von Chromatinverwickelungen (*Chromatin-Entanglements*) wie D-Loops und Holliday Junctions. Während der späteren Mitose können die Chromatinverwickelungen zu Fehlern bei der Chromatidentrennung führen und damit die genomische Integrität der Tochterzellen gefährden. Neben einer ungleichen Verteilung der Schwesterchromatiden auf die Tochterzellen können die *Chromatin-Entanglements* auch durch die mechanischen Zugkräfte des Spindelfaserapparates auseinandergerissen werden, was zu einer Induktion von chromosomalen Brüchen führt. Um dies zu verhindern, werden die intermediären Strukturen der HR nach abgeschlossener Verlängerung der resektierten, einzelsträngigen Bereiche aufgelöst (Abbildung 13). Dabei spielen die Helikase BLM sowie die Endonukleasen Mus81, Gen1, Slx1 und XPF eine tragende Rolle.

Bei BLM handelt es sich um eine 3'-5'-Helikase der RecQ-Familie (*ATP-dependent DNA helicase RecQ*), die zusammen mit TopoIII α und den Faktoren Blap75 und Rmi1 (*RecQ-mediated genome instability 1*) den aktiven BLM/TopoIII α -Komplex bildet und die Auflösung von D-Loops und Holliday Junctions katalysiert (Bachrati 2006; Wu et al. 2006; Bussen et al. 2007). Desweiteren wird dem Komplex auch eine Beteiligung an der Prozessierung von blockierten Replikationsgabeln zugesprochen (Ralf et al. 2006). Die BLM-abhängige Auflösung von Chromatinverwickelungen wird als Dissolution bezeichnet und führt stets zur Ausbildung von *Non-crossover*-Produkten. Innerhalb des Zellzyklus ist der BLM/TopoIII α -Komplex während der S- und der G2-Phase aktiv (Matos et al. 2011).

Bereits zu frühen Zeiten der HR fördert BLM durch eine möglicherweise TopoIII α -modulierten Entwindung der D-Loops den Mechanismus des SDSA, indem es die Ausbildung von komplexen Überkreuzungen, deren spätere Auflösung zu *Crossover*-Produkten führen könnte, vorzeitig verhindert (van Brabant et al. 2000; Bachrati 2006; Bussen et al. 2007). Kommt es trotz der Prävention im Zuge der HR zur Ausbildung einer dHJ, so wird diese, sofern möglich, über den bevorzugten Dissolutionsmechanismus aufgelöst. Hierbei erfolgt nach Abschluss der DNA-Synthese eine BLM/TopoIII α -koordinierte Bewegung der beiden *junctions* (Verzweigungsstellen) aufeinander zu. Treffen die *junctions* aufeinander, kollabieren sie und bilden eine einzelsträngige Struktur, die sog. Hemicatenane aus (Yang et al. 2010b; Mankouri und Hickson 2007). Rmi1 vermittelt anschließend die Beladung von TopoIII α auf die Hemicatenane und stimuliert deren Aktivität. TopoIII α setzt einen transienten DNA-Einzelstrangbruch innerhalb der Hemicatenane, um den intakten DNA-Strang vorbeizuführen

und somit die Überwindung zu entspannen (Yang et al. 2010b). Anschließend ligiert sie den Einzelstrangbruch wieder und schließt damit die Auflösung der Chromatin-Entanglements ab.

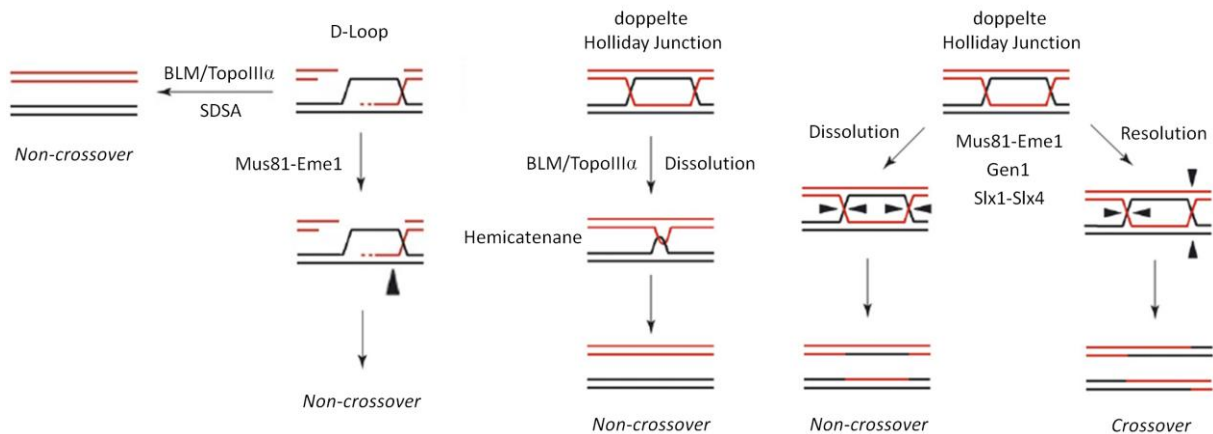


Abbildung 13: Die Auflösung von HR-Intermediaten durch Helikasen und Nukleasen

In der S- und G2-Phase kann der D-Loop bei ausreichender Elongation des invadierten 3'-Endes durch die Helikase BLM (BLM/TopoIIIα) entwunden und die weitere DNA-Synthese anschließend über den Mechanismus des SDSA abgeschlossen werden. Ebenso kann der D-Loop durch das Setzen eines gezielten, transienten Einzelstrangbruchs (schwarzes Dreieck) durch die Endonuklease Mus81 (Mus81-Eme1) während des G2/M-Übergangs bis zur Metaphase aufgelöst werden. Beide Prozesse führen zu *Non-crossover*-Produkten. Bei der BLM-abhängigen Auflösung von doppelten Holliday Junctions (dHJs) bewegen sich die beiden einzelnen HJ unter der Koordination von BLM/TopoIIIα aufeinander zu und kollabieren beim Zusammentreffen unter Ausbildung einer Hemicatenane. Diese wird von der Isomerase TopoIIIα transient geschnitten, sodass sich die Stränge entwenden können und *Non-crossover*-Produkte entstehen. Alternativ können dHJs auch über die Endonukleasen Mus81-Eme1, Gen1 und Slx1-Slx4 prozessiert werden. In Abhängigkeit der bilateralen Schnittrichtungen werden dabei *Non-crossover*- bzw. *Crossover*-Produkte generiert. Generell werden die *Non-crossover*-formende Auflösungsprozesse als Dissolution und die *Crossover*-formende Prozesse als Resolution bezeichnet. (Abbildung verändert nach Mankouri und Hickson 2007).

Neben der Auflösung über den BLM-abhängigen Dissolutionsmechanismus können die intermediären Reparaturstrukturen der HR auch durch verschiedene Struktur-spezifische Endonukleasen über den Prozess der Resolution aufgelöst werden.

Die katalytische Untereinheit Mus81, eine Endonuklease der XPF/Mus81-Nukleasefamilie, bildet zusammen mit Eme1 (*essential meiotic structure-specific endonuclease 1*) den Mus81-Eme1-Komplex. Die Aktivität der Nuklease-Untereinheit wird dabei über den Phosphorylierungsstatus der Eme1-Untereinheit reguliert (Matos et al. 2011). In der G1-, S- und G2-Phase zeigt Mus81 nur eine geringe Aktivität. Gegen Ende der G2-Phase nimmt die Aktivität durch eine Cdk1- und Plk1-induzierte (*polo-like kinase 1*) Hyperphosphorylierung der Eme1-Untereinheit rasch zu und erreicht in der Prometaphase der Mitose ihr Maximum (Matos et al. 2011; Dehé et al. 2013). Analog hierzu wird die Nukleasefunktion auch in der Meiose für einen kurzen Zeitraum aktiviert. Die bevorzugten Substrate von Mus81 weisen mindestens eine Strangunterbrechung auf (Schwartz et al. 2012). Daher werden Strukturen wie 3'-Flap-Strukturen, D-Loops und *nicked* HJs effektiv aufgelöst, während die Prozessierung

von intakten HJ (und dHJ) *in vivo* sehr ineffektiv und umstritten ist (Mimitou und Symington 2009; Schwartz et al. 2012). Nachdem das Mus81-Eme1-Heterodimer die DNA gebunden hat, wird je nach Art des Substrates die entsprechende Struktur durch einen (3'-Flaps und einfache D-Loops ohne *second-end capture*) oder mehrere gezielte Schnitte (*second-end-capture*-Strukturen, HJs) aufgelöst. *In-vitro*-Studien zeigten, dass die Schnitte bei 3'-Flap-Strukturen, D-Loops und nicked HJs eine halbe Helixumdrehung (5 Basen) upstream vom 5'-Ende des jeweiligen Nicks erfolgen (Bastin-Shanower et al. 2003; Hollingsworth und Brill 2004). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass intermediäre *second-end-capture*-Strukturen und HJs bilateral geschnitten werden. Durch das gezielte Setzen von transienten Einzelstrangbrüchen können die überkreuzten DNA-Stränge aneinander vorbeigeführt und somit entspannt werden. Abschließend werden die Lücken im Zucker-Phosphat-Rückgrat durch Ligation verschlossen. Während die Prozessierung von 3'-Flap-Strukturen und einfachen D-Loops stets zu *Non-crossover*-Produkten führt, resultieren aus der Auflösung von *second-end-capture*-Strukturen und HJ in Abhängigkeit von der Schnittrichtung *Crossover*- (gleiche Orientierung) und *Non-crossover*-Produkte (entgegengesetzte Orientierung).

Bei Gen1 handelt es sich um eine strukturspezifische Endonuklease der XPG-Nukleasefamilie, die 5'-Flap-Strukturen und HJ schneidet (Rass et al. 2010). Jüngste Studien haben gezeigt, dass in humanen Zellen die Nukleaseaktivität allein über den Import/Export von Gen1 in den Zellkern reguliert wird, während in Hefen darüber hinaus die Aktivität des orthologen Yen1 auch über den Phosphorylierungsstatus gesteuert wird (Chan und West 2014b). Gen1 liegt im Zytoplasma der Zellen vor und besitzt innerhalb seiner C-terminalen Domäne eine starke NES-Sequenz (*nuclear export signal*), die den Export des Proteins aus dem Zellkern fördert und damit eine Anreicherung von Gen1 im Zellkern erschwert. Während der Prometaphase der Mitose kommt es zur Auflösung der Kernmembran, wodurch die Bindung von Gen1 an die DNA ermöglicht wird und die Nukleaseaktivität schnell steigt. Nach der Wiederherstellung der Kernhülle während der Telophase erfolgt der Export von Gen1 aus dem Zellkern und die Aktivität sinkt.

Da die Auflösung von 5'-Flap-Strukturen nur einen Schnitt erfordert, bindet Gen1 diese Strukturen als Monomer (Rass et al. 2010). HJs werden von Gen1 als Multimer gebunden und koordiniert bilateral geschnitten. Analog zu Mus81 resultieren je nach Orientierung der Schnitte *Crossover*- bzw. *Non-crossover*-Produkte. Nachdem die DNA-Stränge aneinander vorbeigeführt und dadurch entwunden wurden, erfolgt die abschließende Ligation der Einzelstrangbrüche.

Die katalytische Untereinheit Slx1 bildet zusammen mit Slx4 die Endonuklease Slx1-Slx4 (Coulon 2003). Zu ihren Substraten zählen 3'-Flap- und 5'-Flap-Strukturen, blockierte Replikationsgabeln, Haarnadelstrukturen und HJs. Die Auflösung der 3'-Flap- und 5'-Flap-Strukturen erfolgt durch das gezielte Setzen eines Einzelstrangbruchs (3'-seitig und 3 bzw. 3 - 6 nt entfernt von der Verzweigung) in einem DNA-Strang (Wyatt et al. 2013). HJs werden durch symmetrische oder asymmetrische, bilaterale Schnitte aufgelöst. Wie bei Mus81 und Gen1 resultieren in Abhängigkeit der bilateralen Schnitorientierung *Crossover*- bzw. *Non-Crossover*-Strukturen. Im Vergleich zu den durch Gen1 aufgelösten HJs weisen die durch Slx1 entwundenen, linearen DNA-Stränge vermehrt Lücken im Zucker-Phosphat-Rückgrat sowie Flapstrukturen auf. Neuere Studien zeigen, dass Slx4 als eine Art Plattform agiert und neben Slx1 auch Reparaturproteine und die Endonukleasen Mus81 und XPF rekrutiert (Fekairi et al. 2009). Darüber hinaus lagern sich in Abhängigkeit von Cdk1 und Plk1 die Endonukleasen Slx1-Slx4 und Mus81-Eme1 zum Zeitpunkt des G2/M Übergangs zu einem Holoenzym zusammen und erreichen durch eine koordinierte Interaktion eine höhere HJ-Resolvaseaktivität als die jeweiligen Einzelkomplexe (Wyatt et al. 2013).

Das Protein XPF (*Xeroderma pigmentosum complementation group F*) bildet zusammen mit der nicht-katalytischen Untereinheit ERCC1 die Struktur-abhängige Endonuklease ERCC1-XPF (Newman et al. 2005). Die Nuklease ist sowohl an wichtigen DNA-Reparaturprozessen der NER und des SSA, sowie an der generellen Auflösung von DNA-Verzweigungen beteiligt (Al-Minawi et al. 2007; Bowles et al. 2012). Zu den Substraten zählen 3'-/5'-Überhänge, 3'-Flap-Strukturen, DNA-Blasen und Haarnadelstrukturen. Die Auflösung dieser *non-duplex*-Strukturen erfolgt durch das gezielte Setzen einer Läsion im Zucker-Phosphat-Rückgrat des doppelsträngigen Bereiches auf der 5'-Seite der Verzweigungen, wenige Nukleotide vom Übergang der Duplex-DNA zum einzelsträngigen Bereich entfernt (Bardwell et al. 1994; Sijbers et al. 1996). Wie auch die Endonuklease Mus81, interagiert XPF mit dem als Plattform-agierenden Protein Slx4 und prozessiert die Auflösung von 3'-Flap-Strukturen (Fekairi et al. 2009).

2.4 Zielsetzung

Im Rahmen der DNA-Schadensantwort trägt das eng koordinierte Zusammenspiel von DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle eine entscheidende Rolle zur Sicherung der genomischen Integrität von eukaryontischen Zellen bei. Nach einer Schadensinduktion kann durch die Aktivierung verschiedener Checkpoints die Progression der Zelle innerhalb des Zellzyklus zu bestimmten Zeitpunkten unterbrochen werden, um ihr mehr Zeit für die Reparatur der DNA-

Schäden zu gewähren. Nach abgeschlossener Reparatur werden die Checkpoints wieder aufgehoben und die Zellen in die jeweils nächste Zellzyklusphase entlassen. Allerdings konnten frühere Arbeiten dem G2/M-Checkpoint eine Insensitivität gegenüber DSBs nachweisen (Deckbar et al. 2007; Deckbar et al. 2011; Krempler et al. 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der G2/M-Checkpoint zu Zeiten nach Bestrahlung aufgehoben wird, zu denen die Reparatur über den Prozess der HR noch aktiv ist (Beucher et al. 2009). Daraus entwickelte sich die Hypothese, dass G2-Phasezellen mit strahleninduzierten, intermediären Reparaturstrukturen der HR in die Mitose eintreten.

In der vorliegenden Arbeit sollte diese Hypothese näher untersucht werden und Indizien für eine mögliche Existenz von HR-Intermediaten in der Mitose gesucht werden. Die Existenz von HR-Intermediaten, wie D-Loops oder Holliday Junctions, in der Mitose könnte jedoch aufgrund der überkreuzten DNA-Strukturen zu Problemen bei der Chromatidentrennung führen und die genomische Integrität der Zelle gefährden. Daher sollte im zweiten Teil der Arbeit die weitere Prozessierung von möglichen, strahleninduzierten HR-Intermediaten in der Mitose analysiert werden.

3 Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 siRNA

Alle verwendeten siRNAs stammen von der Firma Qiagen und wurden in einer Stockkonzentration von 20 μM angesetzt.

Tabelle 1: Verwendete siRNAs mit ihrer Sequenz und eingesetzten Konzentration

siRNA	Sequenz	eingesetzte Konzentration
siBLM	AAG CTA GGA GTC TGC GTG CGA	50 nM
siCtrl (Kontrolle)	AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT	10 nM
siMus81	AAC AGC CCT GGT GGA TCG ATA	25 nM
siRad54	GAA CTC CCA TCC AGA ATG ATT	25 nM

3.2 Inhibitoren

Tabelle 2: Verwendete Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller	Konzentration (Stocklösung)
B02 (Rad51-Inhibitor)	Calbiochem	50 mM (in DMSO)
Calyculin A	LC Laboratories	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (in DMSO)
Colcemid	Sigma	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (in DMSO)

3.2.1 Antikörper

3.2.1.1 Primär-Antikörper

Tabelle 3: Eingesetzte Primär-Antikörper und eingesetzte Verdünnung

Primär-Antikörper	Hersteller	eingesetzte Verdünnung
rabbit anti-BLM	Abcam	1:100
mouse anti-BrdU	Becton Dickinson	1:100
mouse anti-phospho-H2AX (Ser 139)	Millipore	1:1000
rabbit anti- phospho-H2AX (Ser 139)	Epitomics	1:1000
mouse anti-Mus81	Santa Cruz	1:200

rabbit anti-phospho-Histon 3 (Ser 10)	Millipore	1:1000
rabbit anti-Rad51	Abcam	1:10000
goat anti-Rad54 (D18)	Santa Cruz	1:200

3.2.1.2 Sekundär-Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Sekundär-Antikörper und eingesetzte Verdünnung

Sekundär-Antikörper	Hersteller	eingesetzte Verdünnung
goat anti-mouse IgG-AlexaFluor488	Invitrogen	1:1000
goat anti-mouse IgG-AlexaFluor594	Invitrogen	1:1000
goat anti-rabbit IgG-AlexaFluor488	Invitrogen	1:1000
goat anti-rabbit IgG-AlexaFluor594	Invitrogen	1:1000
donkey anti-goat IgG-AlexaFluor488	Invitrogen	1:1000
donkey anti-rabbit IgG-AlexaFluor594	Invitrogen	1:1000

3.2.2 Verwendete Kits

Click-iT™ EdU Alexa Fluor®647 Imaging Kit	Invitrogen, Karlsruhe
HiPerFect® Transfection Reagent	Qiagen, Hilden

3.2.3 Verwendete FISH-Sonden

Alexa488-labeled C-rich Telomere Probe	Panagene Inc., Daejeon, Korea
--	-------------------------------

3.2.4 Chemikalien

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU)	BD Pharmingen, Heidelberg
5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU)	Invitrogen, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt
DNase	Roche, Mannheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, reinst	AppliChem, Darmstadt
Ethanol, vergällt	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Giemsa	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HCl	Roth, Karlsruhe

Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl	Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mounting Medium (Vectashield®)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Mounting Medium + DAPI (Vectashield®)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
<i>non-essential amino acids</i> (NEAA)	Biochrom AG, Berlin
10xPBS	Biochrom AG, Berlin
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
RNAse	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
TritonX-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Biochrom AG, Berlin
Tween®20	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.2.5 Zellkulturmedien

<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Minimum Essential Medium</i> (MEM) Eagle	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.2.6 Lösungen

3.2.6.1 Zellkultur

Trypsin-EDTA-Lösung	0,5 M EDTA 2,5 % (v/v) Trypsin in 1xPBS	pH 8,0
PBS	137 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ in MilliQ	pH 7,4

3.2.6.2 Chromosomale Spreitungen

KCl-Lösung	75 mM KCl (in MilliQ)
Methanol-/Eisessig-Lösung (Fixativ)	100 % Methanol, 100 % Eisessig (Verhältnis 3:1)

3.2.6.3 Immunfluoreszenzfärbung bei Zellen auf Deckgläsern

Fixierlösung	3,7 % Formaldehyd in 1xPBS
Permeabilisierungslösung	0,25 % TritonX-100 in 1xPBS/1 % FCS
Blockierlösung	5 % BSA in 1xPBS/1 % FCS

3.2.6.4 Immunfluoreszenzfärbung bei chromosomalen Spreitungen

Fixierlösung	3,7 % Formaldehyd in 1xPBS	
Permeabilisierungslösung	120 mM KCl 20 mM NaCl 10 mM Tris 0,1 % (v/v) TritonX-100	pH 7,5
Blockierlösung	150 mM NaCl 20 mM Tris 2 % (v/v) BSA 0,1 % (v/v) TritonX-100 100 µg/ml RNase	pH 7,5

3.2.7 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser (Ø 12 mm)	Roth, Karlsruhe
Deckgläser (rechteckig 28 x 32 mm)	Roth, Karlsruhe
Objektträger Superfrost® (26 x 76 mm)	Roth, Karlsruhe
Objektträger Polysine® Slides (25 x 75 mm)	Thermo Scientific, Langenselbold
Filterkarten ECOfunnel	Tharmac GmbH, Waldsolms
Ibidi µ-Slides VI	ibidi GmbH, Martinsried
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Latexhandschuhe Ansell Derma Clean	Ansell, Brüssel, BEL
Nagellack	Lacura
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten, Glas	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße SafeSeal (1,5 ml; 2 ml)	Roth, Karlsruhe
Wägebapier	Roth, Karlsruhe
Wägeschalen	Roth, Karlsruhe
Wischtücher KimWipes	Neolab, Heidelberg
Zellkulturflaschen (25 cm ² ; 75 cm ²)	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen (35 x 10 mm; 60 x 15 mm)	Thermo Scientific, Langenselbold
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

3.2.8 Geräte

Durchlicht-Mikroskop	Eclipse TS100	Nikon, Düsseldorf
Einfrierbox	NrFreeze	Nalgene, Roskilde, DK
Fluoreszenzmikroskope	Axio Immager.M1	Zeiss, Jena

	Axio Immager.Z2	Zeiss, Jena
	Axio Observer.D1	Zeiss, Jena
	Axioplan 2	Zeiss, Jena
	Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Kühlzentrifugen	5804R + Rotor A-4-44	Eppendorf, Hamburg
	5010R + Rotor A-4-81	Eppendorf, Hamburg
Kühl- und Gefrierschränke		Liebherr, Kirchdorf an der Iller
Kühltruhe (-80°C)	HERAfreeze	Thermo Scientific, Langenselbold
Magnetrührer	Varimag®	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
pH-Meter	pMX2000	WTW, Weilheim
Pipetten	Pipetman (2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe	Pipetboy	Integra, Fernwald
Reinstwasseranlage	Astacus BL µS MT	MembraPure GmbH, Bodenheim
Röntgenröhre	MCN 165/796704	Philips, Hamburg
Sterilwerkbank	HERAsafe	Thermo Scientific, Langenselbold
Stickstofftank	Locator 8 Plus	Thermolyne, Dubuque, USA
Tischschwenkplatte		Fröbel Labortechnik, Lindau
Tischzentrifugen	Mini-Zentrifuge	Neolab, Heidelberg
	Spectrafuge®	
Vortexer	Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waagen	TE1502S	Sartorius mechatronics, München
	TE153S-DS	
Wasserbad	WB14	Memmert, Schabach
Zählkammer	Neubauer-improved	Marienfeld GmbH & CoKG, Lauda-Koenigshofen
Zellkultur-Inkubator	HERAcell 240	Thermo Scientific, Langenselbold
Zytozentrifuge	Cellspin I-8	Tharmac GmbH, Waldsolms

3.2.9 Zelllinien

3.2.9.1 Hamster-Zelllinien - *Chinese hamster ovary* (CHO)

Bei den CHO-Zelllinien handelt es sich um aus den Ovarien des chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) isolierte und immortalisierte Zelllinien. Alle drei verwendeten CHO-Zelllinien wurden in MEM mit 10 % FCS und 1 % NEAA kultiviert.

AA8: CHO-Wildtypzelllinie und parentale Zelllinie zu den Zelllinien 51D1 und irs1SF. Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen im Verhältnis von 1:20 bis 1:30 passagiert.



51D1: CHO-Zelllinie. Durch die biallele Deletion im *rad51d* (Deletion von Exon 4, Aminosäuren 88-115) weist die Zelllinie eine Defizienz in der homologen Rekombination auf (Hinz et al. 2006). Die Zelllinie wurde 2-mal pro Woche im Verhältnis 1:5 bis 1:10 passagiert.

irs1SF: CHO-Zelllinie. Durch eine Mutation in *xrcc3* weist die Zelllinie eine Defizienz in der homologen Rekombination auf. Die Zelllinie wurde 2-mal pro Woche im Verhältnis 1:5 bis 1:10 passagiert.

3.2.9.2 Humane Zelllinien

HeLa: Bei der HeLa-Zelllinie handelt es sich um menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs) der Patientin Henrietta Lacks. Die Zelllinie wurde mit DMEM mit 10 % FCS und 1 % NEAA kultiviert und im Verhältnis 1:8 bis 1:10 zweimal wöchentlich passagiert.

82-6hTert: Bei der 82-6-Zelllinie handelt es sich um primäre humane Hautfibroblasten, die durch Transformation eines h-Tert-Vektors (*human telomerase reverse transcriptase*) immortalisiert wurden. Die transformierte Telomerase wirkt der natürlichen Chromosomenverkürzung bei der Replikation des Genoms entgegen und verlangsamt somit die natürliche Seneszenz. Dadurch lässt sich die Zelllinie über einen längeren Zeitraum kultivieren. Die Kultivierung erfolgte mittels MEM mit 20 % FCS und 1 % NEAA. Die Zellen wurden 2-mal wöchentlich im Verhältnis 1:8 bis 1:10 passagiert.

3.2.10 PC-Softwares

3.2.10.1 Immunfluoreszenzmikroskopie von Zellen auf Deckgläsern

Scansoftware	MetaCyte	MetaSystems, Altlußheim
Aufnahmesoftware	Axiovision	Zeiss, Jena

3.2.10.2 Mikroskopie von chromosomalen Spreitungen

Scansoftware	MSearch	MetaSystems, Altlußheim
Aufnahmesoftware	AutoCapt	MetaSystems, Altlußheim

3.2.10.3 Lebendzellmikroskopie

Aufnahmesoftware	MetaCyte	MetaSystems, Altlußheim
------------------	----------	-------------------------

3.2.10.4 Auswertung der Mikroskopbilder

Bildbearbeitung & Auswertung	ImageJ	http://imagej.nih.gov/ij/
------------------------------	--------	---

3.2.10.5 Statistische Analyse

statistische Analysesoftware	GraphPad Prism 7	www.graphpad.com
------------------------------	------------------	--

3.3 Methoden

3.3.1 Zellkulturmethoden

3.3.1.1 Einfrieren von Zellen

Für eine zeitlich nahezu unbegrenzte Lagerung von Zelllinien wurde das Verfahren der Kryokonservierung genutzt, bei dem die Zellen mit einem speziellen Einfriermedium in sogenannten Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren werden. Hierfür wurden die einzufrierenden Zellen trypsiniert, in frischem Medium aufgenommen und unmittelbar danach für 10 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf etwa $100\text{ }\mu\text{l}$ verworfen, das Zellpellet im Restüberstand resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden $1 - 2 \times 10^6$ Zellen in einem Maximalvolumen von 0,9 ml Zellkulturmedium in ein Kryoröhrchen gefüllt, auf Eis gestellt und die Zellen mit dem selben Volumen an kaltem Einfriermedium (60 % FCS, 20 % DMSO, 20 % Zellkulturmedium) vermengt. Für ein schonendes Einfrieren der Zellen wurden die Kryoröhrchen in einen Gefriercontainer (*Mr. Freeze*, Thermofisher) gestellt und über Nacht auf -80°C gekühlt, wodurch ein kontinuierlicher Temperaturabfall von etwa $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ gewährleistet wurde. Am darauffolgenden Tag wurden die Kryoröhrchen in einen Flüssigstickstofftank überführt und bis zum Auftauen der Zellen dort gelagert.

3.3.1.2 Auftauen von Zellen

Die in Kryoröhrchen abgefüllten und in Stickstoff eingefrorenen Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und bei 37°C im Wasserbad für 1 – 2 min aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden anschließend in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Zelllinien-spezifischem Kulturmedium resuspendiert und mit 300 g bei 4°C für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 8 ml frischem Medium resuspendiert. Nach der Überführung in eine 25 cm^2 -Kulturflasche wurden die Zellen in einem Brutschrank mit Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre und einem CO_2 -Gehalt von 5 % bei 37°C inkubiert.

3.3.1.3 Kultivierung von Zellen

Alle der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden als Monolayer-Kultur (Einschichtzellkultur) kultiviert. Als Kulturgefäße wurden 25 cm^2 - bzw. 75 cm^2 -Kulturflaschen verwendet. Die Kulturen wurden in einem Inkubator mit Wasserdampf-gesättigter

Atmosphäre bei einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Bevor die Zellen eine vollständige Konfluenz aufwiesen, wurden sie Zelllinien-spezifisch 1 – 3-mal wöchentlich zu unterschiedlichen Splittraten passagiert, um eine Verlangsamung der Teilungsrate durch die sonst eintretende Zellkontakthemmung zu verhindern. Hierfür wurde das alte Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit sterilem 1xPBS gewaschen. Die adhären Zellen wurden mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung für 5 – 10 min bei 37°C inkubiert, um sie von der Oberfläche des Kulturgefäßes zu lösen. Die gelösten Zellen wurden anschließend in frischem, vorgewärmten Medium (37°C) aufgenommen, entsprechend der gewünschten Splittrate in ein neues Kulturgefäß mit frischem Medium (37°C) überführt und bei 37°C inkubiert.

3.3.1.4 Aussäen von Zellen

Für die immunfluoreszenzmikroskopischen Foci-Analysen in fixierten Zellen, sowie für die G2/M-Checkpointuntersuchungen in fixierten Zellen wurden die zu untersuchenden Zellen auf Deckgläsern (Ø = 12 mm) in Zellkulturschalen (35 x 10 mm oder 60 x 15 mm) herangezogen. Hierfür wurden 5 bzw. 12 sterile Deckgläser auf dem Boden der Zellkulturschalen ausgelegt. Nachdem das Medium der zu untersuchenden Zellen aus der Kulturflasche abgesaugt worden war, wurden die adhären-wachsenden Zellen mit 1xPBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung für 5 – 10 min bei 37°C inkubiert und in frischem Medium (37°C) aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl mittels Zählkammer wurden je nach Zelllinie, Wachstum und Experiment zwischen 100.000 und 1.000.000 Zellen in die Zellkulturschalen gegeben und mit frischem Medium (37°C) auf ein Gesamtvolumen von 2,2 bzw. 4 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C inkubiert.

3.3.1.5 Transfektion von Zellen mittels "*small interfering RNA*" (siRNA)

Für eine transiente Depletion bestimmter Proteine wurden die Zellen vor dem eigentlichen Versuchsstart mit den jeweiligen siRNAs in den unter Tabelle 5 aufgeführten siRNA-Konzentrationen für die entsprechenden Inkubationszeiten behandelt.

Tabelle 5: Konzentrationen, Inkubationszeiten und die jeweils depletierten Proteine der eingesetzten siRNAs

siRNA	Depletiertes Protein	Konzentration	Inkubationszeit
siBLM	BLM	50 nM	48 h
siCtrl	-	10 nM	48 h
siMus81	Mus81	25 nM	72 h
siRad54	Rad54	25 nM	48 h

Mit Hilfe des Transfektionsreagens "*HiPerfect Transfection Reagent*" wurden die jeweiligen siRNAs in die Zellen transfiziert. Hierfür wurde eine definierte Anzahl an HeLa- bzw. 82-6hTert-Zellen (Tabelle 6) auf Deckgläsern in 22,1 cm²-Zellkulturschalen, oder direkt auf die Oberfläche der Zellkulturschalen ausgesät und bis zur Transfektion der siRNA bei 37°C inkubiert. Für die Transfektion wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Mengen an siRNA, Medium ohne Zusätze und *HiPerfect*-Transfektionsreagenz in einem Gesamtvolumen von 100 µl (je 22,1 cm²-Zellkulturschale) vermengt, 1 min auf dem Vortexer gemixt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zu den ausgesäten Zellen hinzugegeben und für die jeweiligen siRNA-Inkubationszeiten bis zu den weiteren Versuchsschritten bei 37°C inkubiert.

Tabelle 6: Ansätze zur Transfektion von HeLa- und 82-6hTert-Zellen mit siRNA

Inkubationszeit	Zellzahl	Medium (gesamt)	siRNA	Medium ohne alles	HiPerfect
48 h	2,5x10 ⁵ bis 5x10 ⁵	4 ml	4 - 10 µl	78 - 84 µl	12 µl
72 h	2x10 ⁵ bis 4x10 ⁵	4 ml	4 - 10 µl	78 - 84 µl	12 µl

3.3.1.6 Markierung von S-Phasezellen mittels EdU

Die Untersuchungen zum Reparaturverhalten der Zellen nach Bestrahlung erfolgten in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen. Daher war bei der Auswertung eine genaue Differenzierung der jeweiligen Zellzyklusphasen von Nöten. Kurz vor der Schadensinduktion wurden die Zellen mit dem Thymidin-Analogon EdU (5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin) behandelt.

Das EdU wurde im Zuge der DNA-Replikation von S-Phasezellen in das Genom inkorporiert. Nach anschließender Färbung des eingebauten EdUs ließen sich S-Phasezellen von G2-Phasezellen unterscheiden. Für die Markierung der S-Phasezellen wurde EdU in einer Endkonzentration von 5 μ M dem Zellkulturmedium der adhären-wachsenden Zellen hinzugefügt und bei 37°C inkubiert. Bis zur jeweiligen Fixierung der Zellen variierte die Inkubationsdauer zwischen den einzelnen Experimenten, betrug jedoch mindestens 30 min, um einen ausreichenden Einbau des Thymidin-Analogons für den Nachweis zu gewährleisten. Nach der Fixierung und der Behandlung mit den Primär-Antikörpern erfolgte in den Zellen bzw. in den gespreiteten Chromosomen die EdU-Färbung mit Hilfe des EdU-Färbekits "Click-iT™ EdU Alexa Fluor®647 Imaging Kit". Entgegen des Herstellerprotokolls wurde der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® azide (Cy5) im Verhältnis von 1:60 mit MilliQ verdünnt. Die Deckgläser mit den fixierten Zellen bzw. die Objektträger mit den gespreiteten Chromosomen wurden in eine Feuchtekammer gelegt und mit 45 bzw. 200 μ l des Reaktionsansatzes (430 μ l 1xClick-IT reaction buffer, 50 μ l reaction buffer additive (1:10 in MilliQ), 20 μ l CuSO₄ und 1,2 μ l Alexa Fluor® azide (Cy5, 1:60 in MilliQ)) überzogen und für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Präparate für 5 min in 1xPBS bei RT gewaschen.

3.3.1.7 BrdU-/EdU-Doppelmarkierung

Für die γ H2AX-Focianalysen in G2-bestrahlten G1-Phasezellen (Kapitel 4.4.3) wurde für eine genaue Zuordnung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen vor der Schadensinduktion eine BrdU-/EdU-Doppelmarkierung durchgeführt. Wie bei dem unter Kapitel 3.3.1.6 näher beschriebenen Argens EdU handelt es sich auch bei BrdU (5-Bromo-2'-Desoxyuridin) um ein Thymidin-Analogon, welches nach Zugabe zum Zellkulturmedium im Zuge der DNA-Replikation von S-Phasezellen in das Genom inkorporiert wird. Durch eine zeitversetzte Behandlung der Zellen mit BrdU und EdU konnte trotz der langen Reparaturzeiten bei der späteren Analyse der G1-Phasezellen unterschieden werden, welche Zellen sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase bzw. in der G2-Phase befanden.

3 h vor der Bestrahlung wurde BrdU in einer Endkonzentration von 10 μ M sowie 10 min vor der Bestrahlung EdU in einer Endkonzentration von 5 μ M dem Zellkulturmedium hinzugegeben und die Zellen anschließend bis zum Zeitpunkt der Bestrahlung bei 37°C inkubiert. Einige der BrdU-markierten S-Phasezellen schritten in der Zeit zwischen den beiden Markierungen im Zellzyklus fort und befanden sich zum Zeitpunkt der zweiten S-Phasenmarkierung durch EdU bereits in der G2-Phase. Folglich fand bei diesem Teil der BrdU-

markierten Zellen kein EdU-Einbau statt. Alle anderen BrdU-markierten Zellen, die sich noch in der S-Phase befanden, sowie alle neu aus der G1-Phase-kommenden S-Phasezellen inkorporierten EdU in ihr Genom. Nach der EdU-Markierung wurden die Zellen bestrahlt, fixiert und gefärbt. Die für die Auswertung relevanten, G2-bestrahlten G1-Phasezellen waren somit BrdU-positiv/EdU-negativ und konnten von den anderen Zellen klar unterschieden werden.

3.3.2 Induktion von DNA-Schäden mittels Röntgenstrahlung

Sowohl für die Untersuchungen der DSB-Reparaturverhalten der Zellen, SCE-Analysen als auch für die Checkpoint-Analysen wurden in den Zellen DSBs durch ionisierende Strahlung (IR) induziert. Als Strahlenquelle diente die Röntgenröhre MCN 165/796704 der Firma Philips mit einer Wolfram-Anode und einem Beryllium-Austrittsfenster. Für die Bestrahlung wurde eine Beschleunigungsspannung von 90 kV und eine Stromstärke von 19 mA angelegt, wodurch die Elektronen bei der Ionisation bevorzugt über den photoelektrischen Effekt und den Compton-Effekt aus den Atomen gelöst wurden. Über den Abstand der Proben zum Austrittsfenster der Röntgenröhre und über die Bestrahlungsdauer ließ sich die verabreichte Dosis variieren. Mit Hilfe der Fricke-Dosimetrie wurden die Bestrahlungszeiten für die jeweiligen Dosen ermittelt und regelmäßig überprüft. Die in Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen wachsenden Zellen wurden für die Bestrahlung aus dem Brutschrank (37°C) entnommen, auf einem 1 mm dicken Aluminiumblech in einem definierten Abstand (16 cm) über das Austrittsfeld der Röntgenröhre gelegt und für 40 s (2 Gy) bzw. 60 s (3 Gy) bestrahlt. Diese Bedingungen galten jedoch nur für die Bestrahlung von Zellen, die in Kunststoffgefäßen kultiviert wurden. Da Glas eine höhere optische Dichte als Kunststoff besitzt, treten bei der Bestrahlung von Glas mit Röntgenstrahlen vermehrt Sekundärelektronen auf. Diese werden zwar von der Fricke-Dosimetrie nicht detektiert, induzieren dennoch nachweislich in γ H2AX-Focianalysen zusätzliche DSBs in auf Glas-angewachsenen Zellen (Kegel et al. 2007). Dabei lag die Anzahl der γ H2AX-Foci und damit die effektiv verabreichte Strahlendosis etwa doppelt so hoch wie bei den auf Kunststoff angewachsenen Zellen. Dementsprechend wurde die Bestrahlungszeit für die auf Glas angewachsenen Zellen halbiert, um eine mit den auf Kunststoff-angewachsenen Zellen vergleichbare, effektive Strahlendosis zu erhalten. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen bis zur weiteren Versuchsdurchführung bei 37°C inkubiert.

3.3.3 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen auf Deckgläsern

3.3.3.1 Formaldehyd-Fixierung von Zellen auf Deckgläsern

Das Medium der in den mit Deckgläser ausgelegten Zellkulturschalen wurde abgesaugt und die Deckgläser für 10 min bei Raumtemperatur (RT) in 3,7 % Formaldehyd in 1xPBS fixiert. Nach 3 x 10 min Waschen in 1xPBS bei RT wurden die Zellen für 15 min bei 4°C in 0,25 % TritonX-100 in 1xPBS/1 % FCS permeabilisiert. Anschließend wurden die Deckgläser 3 x 10 min bei RT in 1xPBS/1 % FCS gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen für 30 min bei RT in 5 % BSA in 1xPBS/1 % FCS geblockt und bis zur Färbung in der Blockierlösung bei 4°C gelagert.

3.3.3.2 Antikörper- und EdU-Färbung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in fixierten Zellen verschiedene an der DNA-Reparatur beteiligte sowie zellzyklusspezifische Proteine mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Die dabei eingesetzten Antikörperkombinationen, Verdünnungen, Inkubationszeiten und eventuelle, Antikörper-spezifische Abweichungen von der im Folgenden beschriebenen Standardfärbeprozedur sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Nach der Fixierung der auf den Deckgläsern-angewachsenen Zellen wurden die Deckgläser aus der Blockierlösung in eine lichtgeschützte Feuchtekammer überführt und mit 40 - 50 µl der Primär-Antikörperlösung (Primär-Antikörper in 1xPBS/1 % FCS/5 % BSA) überschichtet. Nach einer einstündigen Inkubationszeit im Dunkeln bei RT wurden die Deckgläser 3 x 10 min in 1xPBS/1 % FCS gewaschen. Sofern bei den jeweiligen Experimenten eine Markierung von S-Phasezellen vorgesehen war und die Zellen zuvor mit dem Thymidin-Analogon EdU behandelt wurden, erfolgte vor der Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper die EdU-Färbung mittels Click-IT-Färbung. Dabei wurden die Zellen für 30 min im Dunkeln bei RT mit dem Reaktionsansatz (430 µl 1xClick-IT *reaction buffer*, 50 µl *reaction buffer additive* (1:10 in MilliQ), 20 µl CuSO₄ und 1,2 µl Alexa Fluor® azide (Cy5, 1:60 in MilliQ)) in der Feuchtekammer behandelt. Entgegen der Anleitung des Herstellers wurde der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® azide (Cy5) im Verhältnis von 1:60 mit MilliQ verdünnt, um somit in Kombination mit optional weiteren, im Rotspektrum-fluoreszierenden Immunfarbstoffen eine bessere Differenzierung unter dem Mikroskop erzielen zu können. Nach der EdU-Färbung wurden die Deckgläser für 10 min in 1xPBS gewaschen. Im Anschluss folgte die Inkubation der Zellen mit dem Sekundär-Antikörper. Hierfür wurden die Deckgläser mit 40 - 50 µl der Sekundär-Antikörperlösung (Sekundär-Antikörper in 1xPBS/1 % FCS)

überschichtet und im Dunkeln in der Feuchtekammer für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser 4 x 10 min in 1xPBS/1 % FCS gewaschen. Danach erfolgte die DNA-Färbung mittels DAPI. Die Zellen wurden dabei im Dunkeln für 5 min in 1xPBS + 0,2 µg/ml DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) bei RT inkubiert. Nach einem 5-minütigen Waschschrift in 1xPBS wurden die Deckgläser kurz in MilliQ geschwenkt um überschüssige Salze, die die Immunfluoreszenzaufnahmen beeinträchtigen könnten, zu entfernen. Im Anschluss wurden die Deckgläser für 3 - 5 Minuten zum Antrocknen im Dunkeln bei RT ausgelegt. Zum Schluss wurden die Deckgläser mit 2,5 µl Mounting Medium auf Objektträgern positioniert und die Ränder mit Nagellack versiegelt.

Tabelle 7: Kombinationen, Verdünnungen und Inkubationszeiten der Antikörper bei der Immunfluoreszenzfärbung in fixierten Zellen

Primär-Antikörper-Kombinationen (1.AK)	Verd.	Inkubationszeiten (1. AK)	Sekundär-Antikörper-Kombinationen (2.AK)	Verd.	Inkubationszeiten (2.AK)	Anmerkungen
rabbit anti-phospho-H2AX (Ser 139)	1:1000	1 h bei RT	goat anti-rabbit IgG-AlexaFluor488	1:1000	1 h bei RT	-
mouse anti-phospho-H2AX (Ser 139)	1:1000	1 h bei RT	goat anti-mouse IgG-AlexaFluor488	1:1000	1 h bei RT	-
rabbit anti-phospho-Histon 3	1:1000		goat anti-rabbit IgG-AlexaFluor594	1:1000		
mouse anti-phospho-H2AX (Ser 139)	1:1000	1 h bei RT	goat anti-mouse IgG-AlexaFluor488	1:1000	1 h bei RT	-
rabbit anti-Rad51	1:10000		goat anti-rabbit IgG-AlexaFluor594	1:1000		
rabbit anti-Rad51 goat anti-Rad54 (D18)	1:10000 1:200	ü.N. bei 4°C	donkey anti-rabbit IgG-AlexaFluor594 donkey anti-goat IgG-AlexaFluor488	1:1000 1:1000	1 h bei RT	Inkubation mit Blockierlösung ü.N.; Waschlösung: 1xPBS/1 % FCS/ 0,1 % Tween20
mouse anti-Mus81	1:200	1 h bei RT	goat anti-mouse IgG-AlexaFluor594	1:1000	1 h bei RT	1. AK-Inkubationspuffer: 1xPBS/1 % FCS/ 5 % BSA/ 0,1 % Tween20; Waschlösung: 1xPBS/1 % FCS/ 0,1 % Tween20
rabbit anti-BLM	1:100	1 h bei RT	goat anti-rabbit IgG-AlexaFluor488	1:1000	1 h bei RT	1xPBS/1 % FCS
rabbit anti-phospho-H2AX (Ser 139) mouse anti-BrdU	1:1000 1:100	ü.N. bei 4°C	goat anti-rabbit IgG-AlexaFluor488 goat anti-mouse IgG-AlexaFluor594	1:1000 1:1000	1 h bei RT	1. AK-Inkubationspuffer: Inkubationspuffer des BrdU-Färbekits + 5µg/ml DNase

Für die Analyse von in der G2-Phase-bestrahlten G1-Phasezellen (Kapitel 4.4.3) wurden die fixierten Zellen mit Antikörpern gegen γH2AX und BrdU gefärbt und eine EdU-Färbung durchgeführt. Abweichend von dem eben beschriebenen Färbeprotokoll wurden bei dieser

Färbung die Primär-Antikörper gemeinsam in dem für die BrdU-Färbung notwendigen Inkubationspuffer des BrdU-Färbekits (5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit) vorgelegt. Damit sich der BrdU-Antikörper an die DNA anlagern kann, muss die DNA denaturiert werden. Hierfür wurde der Inkubationspuffer/Antikörper-Lösung 5 µg/ml DNase (Stocklösung 1 mg/ml in 50 % Glycerin + 0,15 M NaCl) hinzugefügt. Die weitere Durchführung erfolgte gemäß der bereits beschriebenen Prozedur.

3.3.4 Chromosomale Studien

3.3.4.1 Colcemid- und Calyculin-Behandlung

Chromosomale Studien wurden in natürlich kondensierten Metaphase-Chromosomen sowie in Chromosomen von G2-Phasezellen durchgeführt. Aufgrund des im Vergleich zu den CHO-Zellen niedrigeren Anteils mitotischer Zellen bei HeLa-Zellen wurden durch eine 60-minütige Inkubation der Zellen bei 37°C mit Colcemid (0,1 µg/ml im Zellkulturmedium) vor den jeweiligen Fixierungszeitpunkten Mitosen in der Metaphase arretiert und somit der Anteil an Metaphasezellen für die Auswertung erhöht. Bei Colcemid handelt es sich um ein antimitotisches Zellgift, das durch die Bindung an Mikrotubuliuntereinheiten deren Polymerisation zu Spindelfasern unterbindet und somit die Depolymerisation der Spindelfaser begünstigt. Dies hat zur Folge, dass die Chromosomen nicht für die anstehende Chromatidenteilung während der Anaphase in der Äquatorialebene angeordnet werden können und die Mitose verharrt in der Metaphase (Jordan und Wilson 2004; Yang et al. 2010a).

Um chromosomale Studien auch in G2-Phasezellen durchführen zu können, wurde durch die Behandlung mit Calyculin A in G2-Phasezellen eine vorzeitige Chromosomenkondensation (PCC = *premature chromosome condensation*) induziert. Bei Calyculin A handelt es sich um eine toxische Okadasäure, die die Aktivitäten der Serin/Threonin Proteinphosphatasen PP1 und PP2A inhibiert, was eine vorzeitige Chromosomenkondensation zur Folge hat (Resjö et al. 1999; Ishihara et al. 1989; Gotoh et al. 1995). Calyculin A wurde für 30 min vor den jeweiligen Fixierungszeitpunkten in einer Endkonzentration von 50 nM den Zellkulturmedien (37°C) beigefügt.

3.3.4.2 Metaphasepräparation mittels Methanol/Eisessig-Fixierung

Zur Ermittlung der chromosomalen Bruchlevel von G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen und Chromosomen der späten Mitose in CHO-Zelllinien (Kapitel 4.3.2 und 4.3.4) sowie für

die Chromatidbruch- und SCE-Analysen in HeLa-Zellen (Kapitel 4.4.1.2 und 4.4.2) wurden die Chromosomen mittels Methanol/Eisessig-Fixierung fixiert und auf Objektträgern gespreitet. Aufgrund des hohen Anteils an mitotischen Zellen bei den CHO-Zelllinien konnten mit Hilfe des "mitotic shake-off"-Verfahrens ohne zusätzliche Behandlung mit Chemikalien genügend Mitosen für die Auswertung isoliert werden. Bei dieser Methode werden die mitotischen Zellen durch die mechanischen Stöße, die durch das Klopfen der Zellkulturflasche auf einen massiven Untergrund induziert werden, von der Oberfläche der Zellkulturflasche gelöst. Da mitotische Zellen im Vergleich zu Interphasezellen nur eine schwache Bindung zur Oberfläche der Zellkulturflasche aufrechterhalten, lösen sich durch die Erschütterungen ausschließlich Mitosen. Da HeLa-Zellen im Vergleich zu den CHO-Zelllinien einen geringeren Anteil an mitotischen Zellen aufweisen, wurde durch die Behandlung mit Colcemid der Anteil an Metaphasezellen künstlich erhöht (Abschnitt 3.3.4.1). Desweiteren wurde für die SCE-Analyse in G2-Phasezellen durch die Behandlung mit Calyculin A eine vorzeitige Chromosomenkondensation induziert (Abschnitt 3.3.4.1). Während der Behandlung mit Calyculin A lösten sich die adhärenenten Zellen ohne Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Oberfläche der Zellkulturflasche bzw. Zellkulturschale.

Die durch das "mitotic shake-off"-Verfahren bzw. durch Calyculin A gelösten Zellen wurden mit dem Medium in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon) überführt und für 10 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 7 ml einer auf 37°C vorgewärmten, 75 mM KCl-Lösung resuspendiert und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Behandlung der Zellen mit der hypotonischen KCl-Lösung führt aufgrund des osmotischen Druckgradienten zu einem Aufquellen der Zellen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Auf dem Vortexer wurde das Zellpellet durch eine tropfenweise Zugabe von 10 ml des eiskalten (-20°C) Fixativs aus 100 % Methanol und 100 % Eisessig im Verhältnis 3:1 resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut für 10 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem Fixativ analog zu der zuvor durchgeführten Prozedur resuspendiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt. Nach Abschluss der Fixierung wurden die Zellen in der Fixativlösung bei -20°C bis zur weiteren Versuchsdurchführung gelagert. Für das Spreiten der Chromosomen auf Objektträgern wurden die Zellen für 10 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert und je nach Größe des Zellpellets in 100 - 2000 µl frischem Fixativ resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden je 20 µl in eine Pipette aufgenommen und auf angefeuchtete Objektträger getropft. Im Zuge des Trocknens der Objektträger bei RT platzten die aufgequollenen Zellen und die Chromosomen wurden auf den Objektträgern

gespreitet. Bis zur anschließenden Färbung der Chromosomen wurden die Objektträger bei RT gelagert.

3.3.4.3 Giemsa-Färbung von gespreiteten Chromosomen

Für die Chromatidbruchstudien in den CHO-Zelllinien Kapitel 4.3.2 und 4.3.4, sowie für die Chromatidbruch- und SCE-Analysen in HeLa-Zellen (Kapitel 4.4.1.2 und 4.4.2) wurde die DNA der Chromosomen mittels Giemsa gefärbt. Hierfür wurden die auf den Objektträgern fixierten und getrockneten Chromosomen für 10 min in einer 6 %-igen Giemsa-Färbelösung (in destilliertem Wasser) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger bei RT für 2 x 10 min in destilliertem Wasser und 1 x 10 min in MilliQ gewaschen. Nachdem die Präparate bei RT getrocknet waren, wurden sie bis zur Auswertung bei RT gelagert.

3.3.4.4 DAPI-Färbung von gespreiteten Chromosomen

Alternativ zu der Giemsa-Färbung wurde die DNA der Chromosomen bei den SCE-Analysen, den DSB-Bruchanalysen auf chromosomaler Ebene, sowie bei den γ H2AX-Focianalysen in chromosomalen Spreitungen mittels DAPI gefärbt. Hierfür wurden die Objektträger nach der FpG- (Abschnitt 3.3.4.5) bzw. nach der γ H2AX-Antikörperfärbung (Abschnitt 3.3.4.7) für 5 min im Dunkeln bei RT mit 0,2 μ g/ml DAPI in 1xPBS behandelt. Anschließend wurden die Präparate für 5 min im Dunkeln bei RT mit 1xPBS gewaschen, kurz in MilliQ geschwenkt und für 15 min im Dunkeln bei RT getrocknet. Abschließend wurden zum Schutz der Chromosomen 3 - 4 Tropfen Mounting Medium auf die Objektträger gegeben, die Chromosomen mit Deckgläsern eingedeckelt und mit Nagellack die Deckglasränder versiegelt. Bis zur Mikroskopie wurden die Objektträger im Dunkeln bei 4°C gelagert.

3.3.4.5 BrdU-Markierung von Zellen und Fluoreszenz plus Giemsa (FpG)-Färbung zur SCE-Analyse

Anhand der SCE-Level (*sister chromatid exchanges* bzw. Schwesterchromatidaustausche) lassen sich Rückschlüsse auf eine Nuklease- bzw. Helikase-abhängige Auflösung von Chromatin-*Entanglements* ziehen (Abschnitt 4.4.2). Hierfür ist jedoch eine Inkorporation des Thymidin-Analogons BrdU (5-Bromo-2'-Desoxyuridin) während der S-Phase über die Dauer von zwei Replikationszyklen der Zelle von Nöten. Aufgrund des semikonservativen Replikationsmechanismus der Zelle, setzt sich jedes Chromosom nach diesen zwei Replikationszyklen aus einem unifilar- und einem bifilar-substituierten Chromatid zusammen. Nach einer speziellen Behandlung und Färbung der Chromosomen lassen sich die verschieden

stark substituierten Chromatiden optisch voneinander unterscheiden, wobei das bifilar-substituierte Chromatid hell und das unifilar-substituierte Chromatid dunkel unter dem Mikroskop erscheint. Sofern es im Zuge der Auflösung von Chromatin-Entanglements zur Ausbildung von Crossover-Produkten kam, lassen sich diese anhand des Farbübergangs von hell zu dunkel auf einem Chromatid nachweisen.

Die Zellen wurden vor der Bestrahlung für 48 h mit einer BrdU-Konzentration von 10 μ M bei 37°C inkubiert. Für die SCE-Analysen in Metaphase- und G2-Chromosomen wurden die Zellen vor den jeweiligen Fixierungszeitpunkten für 1 h mit Colcemid bzw. für 30 min mit Calyculin A behandelt. Die Mitosen wurden anschließend mit Hilfe des "mitotic shake-off"-Verfahrens (Kapitel 3.3.4.2) von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes gelöst und als Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Ebenso wurden die durch die Behandlung mit Calyculin A von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes gelösten Zellen als Zellsuspension zusammen mit dem Medium in Zentrifugenröhrchen überführt, für 5 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Chromosomen wurden mittels Methanol/Eisessig-Fixierung (Kapitel 3.3.4.2) präpariert und auf Objektträgern gespreitet. Im Anschluß folgte die FpG-Färbung. Hierfür wurden die Objektträger für 1 h im Dunkeln mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (Hoechst 33258, 0,5 % in MilliQ) bei RT behandelt. Nachdem die Objektträger für 2 x 10 min in destilliertem Wasser gewaschen wurden, erfolgte die Behandlung der Chromosomen mit UV-Licht. Hierfür wurden 200 μ l Bestrahlungspuffer (97,5 % 0,2 M Natriumhydrogenphosphat, 2,5 % 0,1 M Zitronensäure) auf die Objektträger gegeben, zum Schutz vor Austrocknung ein Deckglas aufgelegt und die Chromosomen für 1 h mit UV-Licht bestrahlt. Die Objektträger wurden für 2 x 10 min in destilliertem Wasser und 1 x 30 min in 2xSSC-Puffer bei 60°C gewaschen. Nach 2 weiteren 10-minütigen Waschvorgängen bei RT in destilliertem Wasser erfolgte die Giemsa-Färbung durch eine 10-minütige Inkubation der Objektträger in einer 6 %-igen Giemsalösung (in destilliertem Wasser) bei RT. Zum Schluss wurden die Objektträger bei RT 2 x 10 min in destilliertem Wasser und 1 x 10 min in MilliQ gewaschen, getrocknet und bis zur Auswertung gelagert. Für die alternative DAPI-Färbung wurden die Chromosomen nach dem zweimaligen Waschen in destilliertem Wasser für 5 min im Dunkeln bei RT mit 0,2 μ g/ml DAPI in 1xPBS inkubiert. Anschließend wurden die Präparate für 5 min im Dunkeln in 1xPBS gewaschen, kurz in MilliQ geschwenkt und 15 min im Dunkeln bei RT getrocknet. Zum Schluß wurden 3 - 4 Tropfen Mounting Medium auf die Objektträger gegeben, die Chromosomen mit Deckgläsern eingedeckelt und die Deckgläseränder mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung der Objektträger bis zur zeitnahen Auswertung erfolgte im Dunkeln bei 4°C.

3.3.4.6 Metaphasenpräparation mittels Zytospin-Zentrifugation

Da eine Antikörperfärbung gegen γ H2AX mit der in Kapitel 3.3.4.2 beschriebenen Methanol/Eisessig-Fixierung nicht kombinierbar ist, wurden die Chromosomen durch die Fixativ-freie Methode der Zytospin-Zentrifugation auf Objektträgern gespreitet. Mit Hilfe des "mitotic shake-off"-Verfahrens (Kapitel 3.3.4.2) wurden die mitotischen Zellen einer in Kulturflaschen wachsenden Zellkultur mittels Klopfen von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst und die so erhaltene Zellsuspension in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon) überführt. Für die γ H2AX-Focianalyse in Chromosomen der G2-Phase wurden G2-Phasezellen in der Zellsuspension nach der Behandlung mit Calyculin A in ein Falcon überführt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 300 g und 4°C wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10 ml einer auf 37°C vorgewärmten, 75 mM KCl-Lösung resuspendiert und die Zellen für 10 min bei 37°C zum Aufquellen im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden etwa 75.000 Zellen in einem Volumen von 500 - 1000 μ l der Zellsuspension entnommen und in die an den Objektträgern montierten Zytospin-Zentrifugenbehälter gegeben. Durch die anschließende Zentrifugation für 10 min bei 1000 rpm bei RT wurden die Zellen auf die Objektträger geschleudert. Aufgrund der starken Zentrifugalkraft platzten die gequollenen Zellen auf und die Chromosomen wurden auf den Objektträgern gespreitet. Im Anschluss wurden die Objektträger zum Trocknen bei RT inkubiert und bis zur Fixierung und Färbung gelagert.

3.3.4.7 γ H2AX- und DAPI-Färbung von gespreiteten Chromosomen

Für die γ H2AX-Focianalysen in G2- und Metaphase-Chromosomen wurden die Zellen, die zuvor mittels Zytospinzentrifugation auf Objektträgern aufgetragen wurden (Kapitel 3.3.4.6), zunächst in 3,7 % Formaldehyd in 1xPBS für 10 min bei RT fixiert und in 1xPBS für 5 min gewaschen. Die anschließende Färbung von γ H2AX auf den Chromosomen erfolgte nach dem zur Optimierung veränderten Färbeprotokoll nach Cesare et al. (Cesare et al. 2009). Dabei wurden durch eine 10-minütige Behandlung mit KCM (120 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,5), 0,1 % Triton X-100) bei RT die Zellen permeabilisiert. Nach einem 5-minütigen Waschschrift in 1xPBS bei RT wurden die Objektträger mit einer Blockierlösung (2 % BSA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7,5), 100 μ g/ml RNase 0,1 % Triton X-100) für 15 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger in einer Feuchtekammer ausgelegt und mit 200 μ l des Primär-Antikörpers rabbit anti-phospho-H2AX in einem Verdünnungsverhältnis von 1:1000 in der Blockierlösung für 1 h bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die Objektträger 3 x 5 min in 1xPBS/0,1 % Tween20 bei RT gewaschen. Anschließend wurden die sich zum

Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen entsprechend dem unter Kapitel 3.3.1.6 beschriebenen Protokoll mittels EdU markiert, gefärbt und bei der späteren Auswertung ausgeschlossen. Danach wurden die Objektträger in der Feuchtekammer mit 200 μ l des Sekundär-Antikörpers goat anti-rabbit IgG-AlexaFluor488 (1:1000 in der Blockierlösung) im Dunkeln für 30 min bei RT inkubiert. In Verbindung mit der Telomer-Markierung (Abschnitt 3.3.4.8) wurde der Sekundär-Antikörper goat anti-rabbit IgG-AlexaFluor594 (1:1000 in der Blockierlösung) verwendet. Nachdem die Objektträger 3 x 5 min in 1xPBS/0,1 % Tween20 bei RT gewaschen wurden, erfolgte die Färbung der DNA der Chromosomen mit DAPI analog zu dem in Kapitel 3.3.4.4 beschriebenen Protokoll.

3.3.4.8 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zur Markierung von Telomer-Sequenzen

Für die Analyse zur Kolo-kalisation von γ H2AX-Foci und Telomeren wurde die FISH-Methode mit der γ H2AX-Färbung auf gespreiteten Chromosomen kombiniert. Hierfür wurden die auf Objektträger gespreiteten Chromosomen nach der Fixierung (Kapitel 3.3.4.6) und der Antikörperfärbung gegen γ H2AX (Kapitel 3.3.4.7) für 5 min mit 3,7 % Formaldehyd in 1xPBS im Dunkeln bei RT behandelt (*crosslinking*-Prozess). Anschließend wurden die Objektträger für 5 min in 1xPBS sowie 1 min in MilliQ bei RT gewaschen und getrocknet. Die darauffolgende FISH mit der Telomer-Sonde (Alexa488-labeled C-rich Telomere Probe) wurde gemäß dem Protokoll des Sondenherstellers Panagene durchgeführt. Abweichend davon erfolgte die Färbung der Chromosomen durch mit DAPI-versetztes Mounting Medium. Hierfür wurden die Objektträger nach der Hybridisierung der Telomer-Sonde mit der DNA und der darauffolgenden Waschschr- itte für 1 min in MilliQ gewaschen und im Dunkeln bei RT getrocknet. Anschließend wurden 1 - 2 Tropfen des mit DAPI-versetzten Mounting Mediums auf den Objektträger getropft und die Chromosomen mit einem Deckglas eingedeckelt. Zum Schluß wurden die Deckglasränder mit Nagellack versiegelt.

3.3.5 Mikroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Mikroskoptypen verwendet. Für die Lebendzellmikroskopie wurde ein aufrechtes Mikroskop vom Typ Axiovert 200M der Firma Zeiss verwendet, um das ein Kunststoffgehäuse mit integrierter Heizung (gebaut von der Werkstatt des FB Biologie) errichtet war, welches zusammen mit einem CO₂-Begasungscontroller (Pecan) als Inkubator fungierte. Die immunfluoreszenz-mikroskopischen, sowie durchlichtmikroskopischen Untersuchungen in fixierten Zellen und gespreiteten Chromosomen wurden an einem aufrechten Mikroskop vom Typ Axio Imager Z2 der Firma

Zeiss durchgeführt. Die manuelle Auswertung von Foci-Analysen in auf Deckgläsern fixierten Zellen erfolgte größtenteils an einem aufrechten Mikroskop vom Typ Axio Imager.M1 der Firma Zeiss. Die Mikroskope verfügten über einen motorisierten Kreutztisch, einen z-Focus, einen Fluoreszenzfilter-Wechsler und eine HBO 100 Lampe als Lichtquelle. Die Steuerung der Mikroskope erfolgte über die Software Metafer 4. Darüber hinaus verfügten die beiden Mikroskope Axiovert 200M und Axio Imager Z2 über eine Kamera vom Typ CV-M4+CL (Jai) bzw. Cool Cube 1 (MetaSystems). In Kombination mit den Softwares Metafer 4, MetaCyte, MSearch und AutoCapt der Firma MetaSystems konnten fixierte Zellen und gespreitete Chromosomen eingescannt, ausgewählt und fotografiert werden, sowie beim *live cell imaging* Aufnahmen von lebenden Zellen gemacht werden.

3.3.5.1.1 Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von fixierten Zellen

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von auf Deckgläsern fixierten Zellen wurden an einem inversen Immunfluoreszenzmikroskop vom Typ Axiovert 200M angefertigt. Hierfür wurden die Zellen nach der Färbung mit Hilfe der Kamera vom Typ AxioCam MRm und der Software Axiovision bei 100facher oder 1000facher Vergrößerung in den jeweiligen Kanälen aufgenommen.

3.3.6 Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Giemsa gefärbten Chromosomen

Chromosomale Analysen erfolgten anhand von durchlichtmikroskopischen Aufnahmen der Chromosomenspreitungen. Hierfür wurden die Objektträger nach der Giemsa-Färbung der Chromosomen (Kapitel 3.3.4.3) an einem aufrechten Mikroskop vom Typ Axio Imager Z2 der Firma Zeiss mit der Software MSearch der Firma MetaSystems bei 100facher Vergrößerung eingescannt und die gespreiteten Chromosomen erkannt. Anschließend wurden mit Hilfe der Software AutoCapt (MetaSystems) die Chromosomen relokier und bei 630facher Vergrößerung durchlichtmikroskopische Aufnahmen der Spreads gemacht. Die Auswertung der Bilder erfolgte manuell am Computer mittels der Software ImageJ.

3.3.7 Immunfluoreszenzmikroskopische Auswertung

3.3.7.1 G2/M-Checkpointuntersuchungen

Für die G2/M-Checkpointanalysen in den auf Deckgläsern-fixierten CHO-Zellen wurden die Zellen gegen phosphoryliertes Histon 3 (pH3) gefärbt (Abschnitt 4.1.1). Das pH3 wurde als Mitosemarker verwendet, da gegen Ende der G2-Phase die Phosphorylierung des Histons 3

am Serin 10 einsetzt und in der Metaphase ihr Maximum erreicht, bis in der Anaphase die Dephosphorylierung einsetzt und in der Telophase nur noch ein sehr schwaches Phosphorylierungssignal auftritt (Hans und Dimitrov 2001). Nach der Antikörper- und DNA-Färbung (Abschnitt 3.3.3.2) wurden die Zellen am Immunfluoreszenzmikroskop im DAPI- und TexasRed-Kanal (pH3) bei 100facher Vergrößerung eingescannt. Mit Hilfe der Software Metafer 4 der Firma MetaSystems wurden die Zellen anhand der DAPI gefärbten DNA im Zellkern erkannt und konnten zur späteren Betrachtung individuell relokieren werden. Desweiteren konnten die Zellen durch die Software entsprechend ihrer pH3-Signalintensitäten sortiert werden. Die Anzahl der pH3-positiven Zellen wurde ermittelt und durch die Gesamtzellzahl dividiert, um den mitotischen Index zu erhalten.

3.3.7.2 Zellzyklusspezifische Differenzierung der Zellen mittels DAPI- und EdU-Intensität

Die Auswertungen der zellzyklusspezifischen γ H2AX- und Rad51-Focianalysen von auf Deckgläsern angewachsenen, fixierten Zellen erfolgten am Immunfluoreszenzmikroskop. Nach der Färbung der Zellen wurden die Zellen mit Hilfe der Software Metafer 4 der Firma MetaSystems am Immunfluoreszenzmikroskop bei 100facher Vergrößerung im DAPI- und Cy5-Kanal (EdU) eingescannt. Dabei konnte die zum DNA-Gehalt der Zelle proportionale DAPI-Intensität, sowie die EdU-Intensität gemessen und so die Zellzyklusphase jeder einzelnen Zelle ermittelt werden (Abbildung 14). G1-Phasezellen weisen aufgrund ihres einfachen Chromosomengehaltes eine geringe DAPI-Intensität und kein inkorporiertes EdU auf. S-Phasezellen sind EdU-positiv und zeigen einen einfachen bis doppelten DAPI-Gehalt. G2-Phasezellen weisen aufgrund ihres doppelten DNA-Gehaltes eine hohe DAPI-Intensität, jedoch keine EdU-Inkorporation auf. Trägt man die EdU-Intensität gegen die DAPI-Intensität in einem Dot-Plot auf, so erhält man eine Aufteilung der Zellen entsprechend ihrer Zellzyklusphasen. Für eine Zellzyklusphasen-spezifische Auswertung lassen sich die jeweiligen Subpopulationen gezielt auswählen und auf Einzelzellebene analysieren. Die Auswertung der entsprechenden Zellen erfolgte manuell am Mikroskop bei 1000facher Vergrößerung.

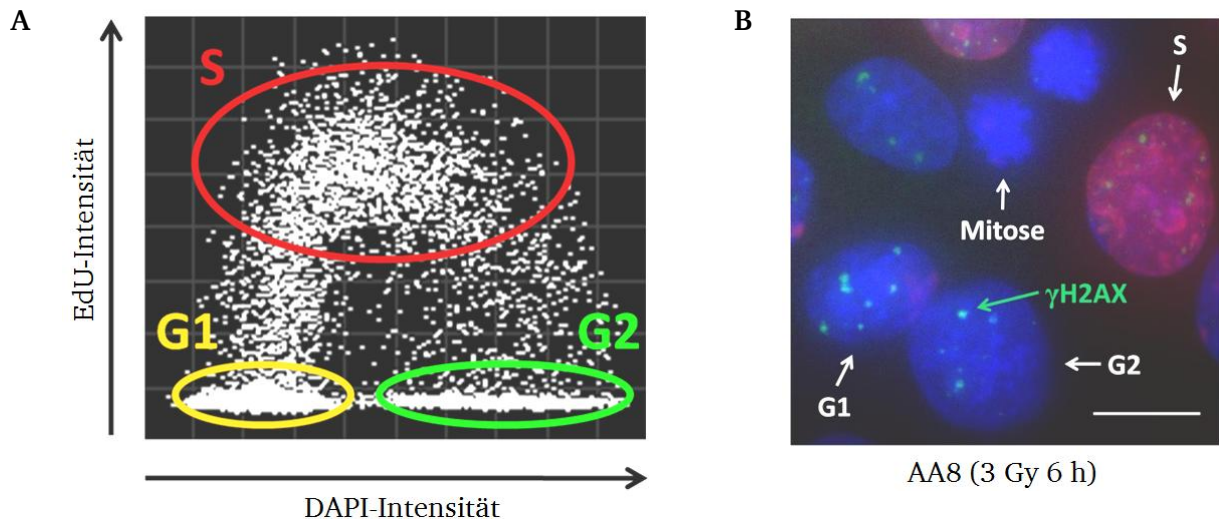


Abbildung 14: Zellzyklusspezifische Differenzierung von fixierten Zellen

(A) Exemplarische Zellzyklusverteilung von CHO AA8 wt-Zellen nach Bestrahlung (6 h nach 3 Gy). Die DAPI- und EdU-Intensitäten der einzelnen Zellen wurden am Immunfluoreszenzmikroskop mit Hilfe der Software Metafer 4 von MetaSystems gemessen. Durch die graphische Auftragung der relativen EdU-Intensität gegen die relativen DAPI-Intensität in Form eines Dot-Plots lassen sich drei Subpopulationen identifizieren. G1-Phase: Zellen mit einfachem DAPI-Gehalt, aber ohne EdU-Inkorporation. S-Phase: Zellen mit einfachem bis doppeltem DAPI-Gehalt und eingebautem EdU. G2-Phase: Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt, aber ohne EdU-Inkorporation. Für die Auswertung lassen sich die Zellpopulationen Zellzyklusphasen-spezifisch auswählen und die einzelnen Zellen relokieren.

(B) Exemplarische, immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme von CHO AA8 wt-Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen mit γ H2AX-Foci nach Bestrahlung (6 h nach einer Dosis von 3 Gy). Der Maßstab entspricht 10 μ m.

3.3.7.3 γ H2AX-Focianalysen in auf Deckgläsern fixierten Zellen

Nach der Antikörperfärbung gegen γ H2AX und der DNA-Färbung (Kapitel 3.3.3.2) wurden die Zellen am Immunfluoreszenzmikroskop mit Hilfe der Software Metafer 4 der Firma MetaSystems im DAPI- und im Cy5-Kanal (EdU) bei 100facher Vergrößerung eingescannt und die Zellen der zu untersuchenden Zellzyklusphase ausgewählt. Anschließend wurden die jeweiligen Zellen relokiert und das γ H2AX-Focilevel manuell am Mikroskop bei 1000facher Vergrößerung ermittelt. Für jeden Datenpunkt eines Experimentes wurden die Fociwerte von 40 Zellen bestimmt und das Experiment mehrfach wiederholt.

3.3.7.4 γ H2AX-Focianalysen auf chromosomalen Spreitungen

Für die Auswertung der γ H2AX-Focianalysen in G2- und Metaphase-Chromosomen sowie für die Analysen zur Kolo-kalisation von γ H2AX-Foci und Telomeren in Metaphase-Chromosomen wurden die auf Objektträgern fixierten und gefärbten Chromosomen an einem Immunfluoreszenzmikroskop vom Typ Axio Imager Z2 der Firma Zeiss im DAPI-Kanal bei 100facher Vergrößerung eingescannt. Mit Hilfe der Software MSearch der Firma MetaSystems ließen sich somit gespreitete Chromosomen detektieren und auswählen. Anschließend

wurden mit Hilfe der Software AutoCapt der Firma MetaSystems bei 630facher Vergrößerung immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Chromosomen mit γ H2AX-Foci und DAPI als DNA-Farbstoff bzw. mit γ H2AX-Foci, durch Sonden markierte Telomere und DAPI als DNA-Farbstoff angefertigt. Ebenso wurde eine mögliche EdU-Inkorporation ins Genom auf den Bildern festgehalten. Die darauffolgende Auswertung der Bilder erfolgte manuell am Computer mit Hilfe der Software ImageJ. In der Regel wurden für jeden Datenpunkt eines Experimentes die Fociwerte von 40 Zellen ermittelt und die Experimente meist mehrfach wiederholt.

3.3.7.5 SCE- und Chromatidbruchanalysen in HeLa-Zellen

Nach der FpG-Färbung (Kapitel 3.3.4.5) wurde die DNA der auf den Objektträgern gespreiteten Chromosomen mittels DAPI oder Giemsa gefärbt (Kapitel 3.3.4.3 und 3.3.4.4). Die SCE- und Chromatidbruchlevel wurden anhand von mikroskopischen Aufnahmen der Spreads ermittelt. Das Protokoll zur Erstellung von durchlichtmikroskopischen Bildern von Giemsa gefärbten Chromosomen ist dem Kapitel 3.3.6 zu entnehmen. Im Gegensatz zu den Giemsa gefärbten Chromosomen wurden die Objektträger nach der DAPI-Färbung am Immunfluoreszenzmikroskop bei 100facher Vergrößerung im DAPI-Kanal eingescannt und die gespreiteten Chromosomen mit Hilfe der Software MSearch (MetaSystems) erfasst. Anschließend wurden die Spreads mit der Software AutoCapt (MetaSystems) reloziert und von den Chromosomen im DAPI- und Cy5-Kanal (EdU) bei 630facher immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die Auswertung der Bilder erfolgte manuell am Computer mit Hilfe der Software ImageJ. Dabei wurden die SCE-Level der gespreiteten Chromosomen sowie die Anzahl der Chromatidbrüche pro Zelle ermittelt. Für jeden Datenpunkt wurde der Mittelwert aus 40 ausgewerteten Zellen gebildet. Aufgrund des variierenden Chromosomensatzes bei HeLa-Zellen wurden die Mittelwerte auf 70 Chromosomen normiert.

3.3.7.6 Zellzyklusuntersuchungen mittels Lebendzellmikroskopie

Für die G2/M-Checkpointuntersuchungen nach Bestrahlung wurden die CHO-Zellen für die Lebendzellmikroskopie in speziellen Kanälen auf den sogenannten μ -Slides VI der Firma Ibidi kultiviert. Hierfür wurden je 30 μ l einer Zellsuspension der CHO-wt-Zelllinie AA8 mit 100.000 Zellen/ml (300.000 Zellen/ml bzw. 330.000 Zellen bei den HR-Mutanten 51D1 bzw. irs1SF) in einen Kanal pipettiert. Nachdem die Zellen auf der Oberfläche adhärent angewachsen waren (30 - 60 min), wurden die Reservoirs mit 60 μ l Kulturmedium aufgefüllt,

zum Schutz vor Austrocknung mit 15 μ l Silikonöl versiegelt und für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Der Gasaustausch mit der Umgebung wurde durch die Gaspermeabilität des Silikonöls, sowie der Böden der μ -Slides gewährleistet. Aufgrund der geringen Mediumsmenge in den dünnen Kanälen wurde täglich ein Mediumswechsel durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurde der Mikroskop-Inkubator (hergestellt durch die Werkstatt des FB Biologie) auf eine Umgebungstemperatur von 37°C aufgeheizt und mit Hilfe eines CO₂-Controllers (Pecon) eine 5 %-ige CO₂-Atmosphäre darin erzeugt. Anschließend wurden die Ibidi-Objektträger im Mikroskop-Inkubator inkubiert. Mit Hilfe der Software MetaCyte der Firma MetaSystems wurden in dem Zeitraum von 30 min vor der Bestrahlung bis 6 h nach der Bestrahlung alle 30 min bei 100facher Vergrößerung im Durchlicht großflächige Aufnahmen der Zellen in den Ibidi-Kanälen gemacht. Für die Bestrahlung der Zellen wurden die Ibidi-Objektträger aus dem Mikroskop-Inkubator genommen, mit der Röntgenröhre bestrahlt und anschließend wieder im Mikroskop-Inkubator inkubiert. Aufgrund der zuvor erstellten Positionsliste konnten stets dieselben Ausschnitte auf dem Ibidi-Objektträger relokiert und aufgenommen werden.

3.3.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Experimente wurde mit Hilfe der Software GraphPad Prism 7 durchgeführt. Hierbei wurde je nach Bedarf der ungepaarte (*two-tailed*) *Student's t-test* (Abbildung 20, Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 28) oder die Varianzanalyse *one-way ANOVA* in Verbindung mit dem *Tukey's multiple comparison test* (Abbildung 17, Abbildung 22, Abbildung 27, Abbildung 32) angewendet. Signifikante Unterschiede wurden in den Abbildungen durch Asterisks gekennzeichnet (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$). Beim Vergleich zweier nicht direkt miteinander vergleichbaren Messgrößen wurde die Fehlerfortpflanzung angegeben (Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 31).

4 Ergebnisse

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der G2/M-Checkpoint nach der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung schnell aktiviert wird, jedoch eine Insensitivität gegenüber DSBs aufweist (Deckbar et al. 2007; Deckbar et al. 2011; Krempler et al. 2007). Dies äußert sich sowohl durch eine hohe Strahlendosis ($> 0,6$ Gy), und damit eine hohe Anzahl an induzierten DSBs (9 - 12 DSBs), die für eine vollständige Aktivierung des G2/M-Checkpoints benötigt wird, als auch in Form einer vorzeitigen G2/M-Checkpointaufhebung vor Abschluss der DSB-Reparatur. Als Folge der vorzeitigen Checkpointaufhebung treten in der G2-Phase bestrahlte Zellen mit etwa 10 - 20 unreparierten Brüchen in die Mitose ein. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die zu späten Zeiten noch unrepariert verbliebenen Brüche über den langsamen und komplexen Weg der homologen Rekombination (HR) repariert werden (Beucher et al. 2009). Aus diesen Ergebnissen heraus entwickelte sich die Hypothese, dass G2-bestrahlte Zellen mit intermediären Strukturen der HR wie z.B. resektierte Bereiche, D-Loops oder Holliday Junctions in die Mitose eintreten.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit sollte diese Hypothese näher untersucht und durch Hinweise auf die Existenz von HR-Intermediaten in der Mitose untermauert werden. Hierfür sollte zunächst untersucht werden, welche Auswirkungen eine Inhibierung der HR auf das γ H2AX-Focilevel und das Chromosomenbruchlevel in der Mitose hat und inwiefern sich diese von den Leveln in wt-Zellen unterscheiden. Anhand dieser Ergebnisse könnten möglicherweise weitere Rückschlüsse auf die Existenz von HR-Intermediaten zu Beginn der Mitose gezogen werden. Die Versuche wurden mit den HR-defizienten Zelllinien 51D1 und irs1SF, sowie der entsprechenden wt-Zelllinie AA8 durchgeführt. Dabei handelt es sich um immortalisierte Zelllinien aus den Ovarien des chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) (CHO) (Hinz et al. 2006). Bei der Zelllinie 51D1 ist das Rad51 Paralog *rad51d* biallel deletiert. Bei der Zelllinie irs1SF weist das Rad51 Paralog *xrcc3* eine Mutation auf. Zusammen mit den drei weiteren Rad51 Paralogen Rad51B, Rad51C und XRCC2 bilden Rad51D und XRCC3 die Rad51-Rekombinase und formen das Rad51-Nukleoproteinfilament. Aufgrund der Deletion bzw. Mutation zeigen beide Zelllinien einen Defekt bei der Ausbildung des Rad51-Nukleoproteinfilaments nach der Resektion der DSB-Enden. Dies hat zur Folge, dass die Suche nach homologen Sequenzen, sowie die Stranginvasion in das homologe Schwesterchromatid, zwei essentielle Schritte der HR, unterbunden sind.

4.1 Zellzyklusanalysen in HR-defizienten CHO-Zelllinien

Bisherige Untersuchungen zum Zusammenspiel von DNA-Reparatur und G2-Checkpointverhalten wurden in unserer Arbeitsgruppe an humanen Zelllinien durchgeführt. Daher war eine genauere Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs von Reparatur und Zellzyklusverhalten der CHO-Zelllinien notwendig. Hierbei sollte zum einen untersucht werden, ob auch CHO-Zelllinien die für humane Zellen beschriebene G2/M-Checkpoint-Insensitivität aufweisen, zum anderen sollten zur Planung der weiteren Experimente die Zeitpunkte nach Bestrahlung bestimmt werden, zu denen die Zellen aus der G2-Phase in die darauffolgende Mitose eintreten und inwiefern sich das Verhalten der HR-Mutanten gegenüber dem Verhalten von wt-Zellen unterscheidet. Hierfür wurden die Zellen mit 3 Gy bestrahlt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Anteil der mitotischen Zellen (mitotischer Index, MI) anhand von zwei Methoden, zunächst mittels Immunfluoreszenzmikroskopie, anschließend mittels Lebendzellmikroskopie bestimmt.

4.1.1 G2/M-Checkpointanalysen nach Bestrahlung in fixierten Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die immunfluoreszenzmikroskopische Ermittlung des MI wurden mitotische Zellen mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen das phosphorylierte Histon 3 (pH3) angefärbt. Die Phosphorylierung des Histons 3 ist ein essentieller Schritt der Chromosomenkondensation und wird von Aurora-A und Aurora-B, zwei Kinasen der Aurora/AIK Familie, reguliert (Crosio et al. 2002). In Säugerzellen beginnt die Phosphorylierung des Histons 3 am Serin 10 während der späten G2-Phase in Bereichen nahe des Centromers der Chromosomen. Bis zur späten Prophase breitet sich die Phosphorylierung auf das gesamte Chromosom aus und erreicht in der Metaphase sein Maximum, bevor in der Anaphase die Dephosphorylierung einsetzt, welche bis zur frühen Telophase abgeschlossen ist (Hans und Dimitrov 2001). Die auf Deckgläsern adhärent wachsenden Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt, stündlich über einen Zeitraum von 6 h fixiert und mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen pH3 und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Die Auswertung erfolgte unter dem Immunfluoreszenzmikroskop. Dabei wurde nach dem Einscannen der Zellen und der Zellkernerkennung im DAPI-Kanal die Anzahl der pH3-positiven Zellen (Mitosen) ermittelt, dieser Wert durch die Gesamtzellzahl dividiert und somit der MI errechnet.

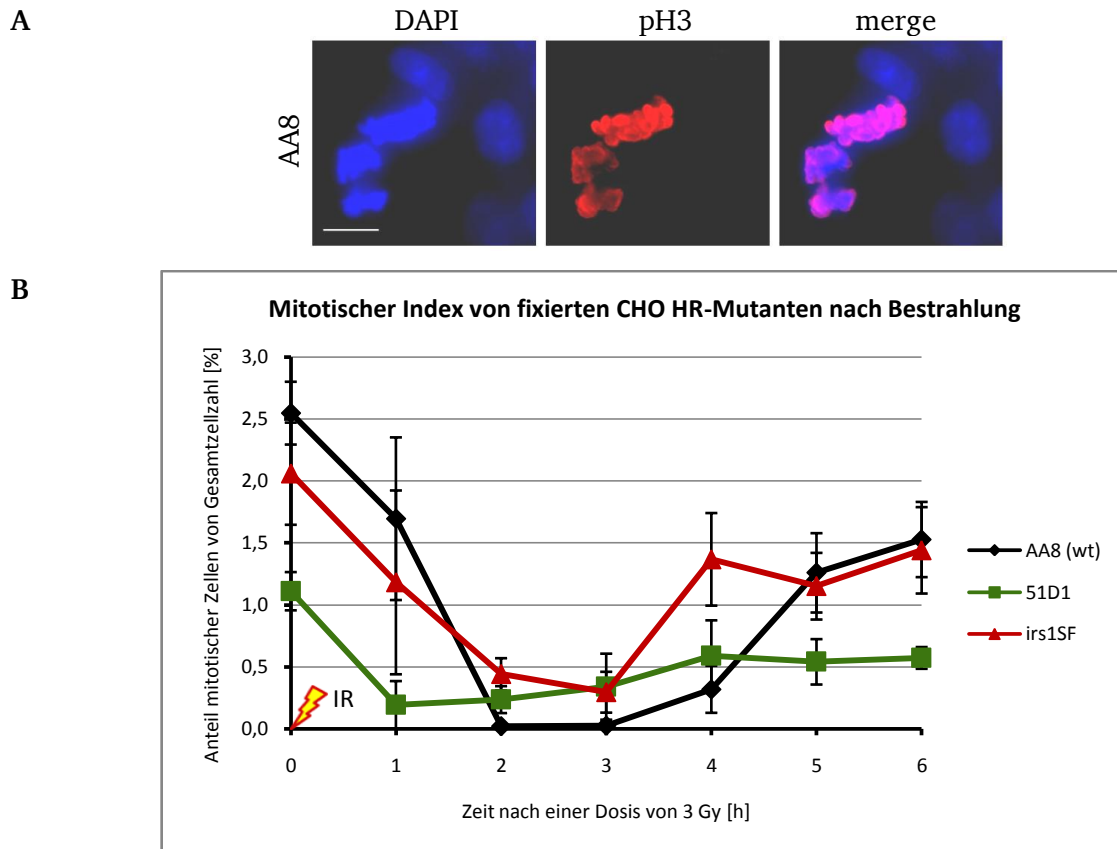


Abbildung 15: Mitotischer Index (MI) nach einer Bestrahlung mit 3 Gy in fixierten CHO-Zelllinien. Exponentiell wachsende CHO HR-Mutanten und wt-Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt, stündlich über einen Zeitraum von 6 h fixiert und mit Antikörpern gegen pH3 (rot) und DAPI als DNA-Farbstoff (blau) gefärbt. Pro Datenpunkt und Experiment wurden 5000 - 10000 Zellen eingescannt und der Anteil an pH3-positiven Zellen (Mitosen) bestimmt und der MI berechnet.

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mitotischen, pH3-positiven Zellen. Zu sehen sind eine Metaphase (obere Zelle) und eine Anaphasezelle (untere Zelle). Der Maßstab entspricht 10 μm .

(B) Graphische Darstellung des MI über die Zeit. Die Datenpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten von $n \geq 3$ Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Im unbestrahlten Zustand zeigt der wt AA8 einen MI von etwa 2,5 % (Abbildung 15 B). Nach der Bestrahlung wird der G2/M-Checkpoint aktiviert und sinkt innerhalb von 2 h auf 0 %. Etwa 4 h nach der Bestrahlung wird der Checkpoint wieder aufgehoben und die G2-Zellen in die Mitose entlassen. Folglich steigt der MI, erreicht aber bis zum Versuchsende nach 6 h nicht mehr den Ausgangswert von 2,6 %. Generell zeigen die HR-defizienten Zelllinien 51D1 und irs1SF im unbestrahlten Zustand einen geringeren MI als der wt AA8, was ein langsames Wachstum der HR-Mutanten verdeutlicht. Nach der Bestrahlung wird der G2/M-Checkpoint aktiviert, jedoch ist der Rückgang des MI schwächer ausgeprägt als beim wt AA8 und erreicht 3 h nach Bestrahlung mit etwa 0,3 % sein Minimum. Anschließend wird der Checkpoint aufgehoben und die G2-Zellen treten wieder in die Mitose ein. Während beim wt AA8 im Zeitraum von 3 - 4 h nach Bestrahlung nur ein schwacher Anstieg des MI zu beobachten ist, steigt dieser bei der HR-Mutante irs1SF deutlich an. Bis zum Versuchsende (6 h) steigt der MI

von irs1SF weiter an, erreicht aber nicht mehr sein Ausgangslevel. Auch bei der HR-Mutante 51D1 wird der G2/M-Checkpoint nach der Bestrahlung aktiviert. Bereits 1 h nach Bestrahlung erreicht der MI sein Minimum. 3 h nach der Bestrahlung, und damit 1 h früher als beim wt AA8 und der HR-Mutante irs1SF, erfolgt die Checkpointaufhebung bei 51D1. Jedoch steigt der MI nur leicht an und erreicht 4 h nach Bestrahlung bereits sein neues Maximum, welches ebenfalls unterhalb des Ursprungslevels liegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der G2/M-Checkpoint sowohl beim wt als auch bei den HR-Mutaten unmittelbar nach der Bestrahlung aktiviert wird, wodurch G2-Phasezellen vom Eintritt in die Mitose zurückgehalten werden. Da sich die zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits in der Mitose befindenden Zellen trotz Bestrahlung innerhalb von etwa 1 h teilen (Harada und Morris 1981), nimmt die Anzahl an mitotischen Zellen nicht abrupt ab, sondern sinkt gleichmäßig bis auf das Zelllinien-spezifische Minimum. Nach einer Reparaturzeit von 3 - 4 h wird der G2/M-Checkpoint wieder aufgehoben, was tendenziell bei den HR-Mutanten früher passiert als bei den wt-Zellen.

Im Gegensatz zum wt, sinken die MIs der HR-Mutanten nach Bestrahlung nicht bis auf 0 %. Dies könnte bei den HR-Mutanten auf Probleme und Verzögerungen beim Durchlaufen der Mitose zurückzuführen sein und würde die Ergebnisse früherer Arbeiten bestätigen, die in unbestrahlten Zellen nach der Depletion von unterschiedlichen HR-Faktoren eine verlängerte Mitosedauer zeigen (Griffin et al. 2000; Fuller und Painter 1988; Tebbs et al. 1995; Rodrigue et al. 2013). Außerdem handelt es sich bei der Bestimmung des MI anhand des pH3-Signals mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nur um eine Momentaufnahme, die lediglich quantitative Informationen über die Anzahl mitotischer Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt liefert. Verlängerte Mitosedauern der HR-Mutanten könnten somit das Ergebnis des über das pH3-Signal ermittelten MI in fixierten Zellen verfälschen. Zudem erschweren sie den Vergleich mit der wt-Zelllinie AA8, die eine kürzere Mitosedauer aufweist. Aus diesem Grund sollten im Folgenden die hier erhaltenen Ergebnisse mit Hilfe der Lebendzellmikroskopie überprüft werden.

4.1.2 G2/M-Checkpointanalysen nach Bestrahlung mittels Lebendzellmikroskopie

Für eine genauere Charakterisierung des G2/M-Checkpointverhaltens der CHO-Zelllinien AA8, 51D1 und irs1SF wurden in weiteren Versuchen die MIs mittels Lebendzellmikroskopie bestimmt. Im Gegensatz zu der immunfluoreszenzmikroskopischen Ermittlung der MIs in fixierten Zellen, die nur eine Analyse der Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung zulässt, bietet

die Lebendzellmikroskopie die Möglichkeit die Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg zu untersuchen.

Bei den lebendzellmikroskopischen Untersuchungen wurden die MIs anhand eines kurzen, klar definierten mitotischen Ereignisses, der Cytokinese, ermittelt. Dazu wurden die Zellen in Ibidi μ -Slides ausgesät und nach 2-tägigem Wachstum mit 3 Gy bestrahlt. Über einen Zeitraum von 30 min vor Bestrahlung bis 6 h nach Bestrahlung wurden von den Zellen alle 30 min Bilder aufgenommen und diese anschließend am Computer manuell ausgewertet. Mitotische Zellen unterscheiden sich morphologisch von Interphasezellen durch ihr rundes, weißumrandetes Erscheinungsbild im Phasenkontrast. Als „Cytokinese“ wurde der Zeitpunkt definiert, zu dem erstmals 2 Tochterzellen zu erkennen waren (Abbildung 16 A, 3. Bild von links). Die Anzahl der Cytokinesen wurde durch die Gesamtzellzahl dividiert und somit der MI berechnet.

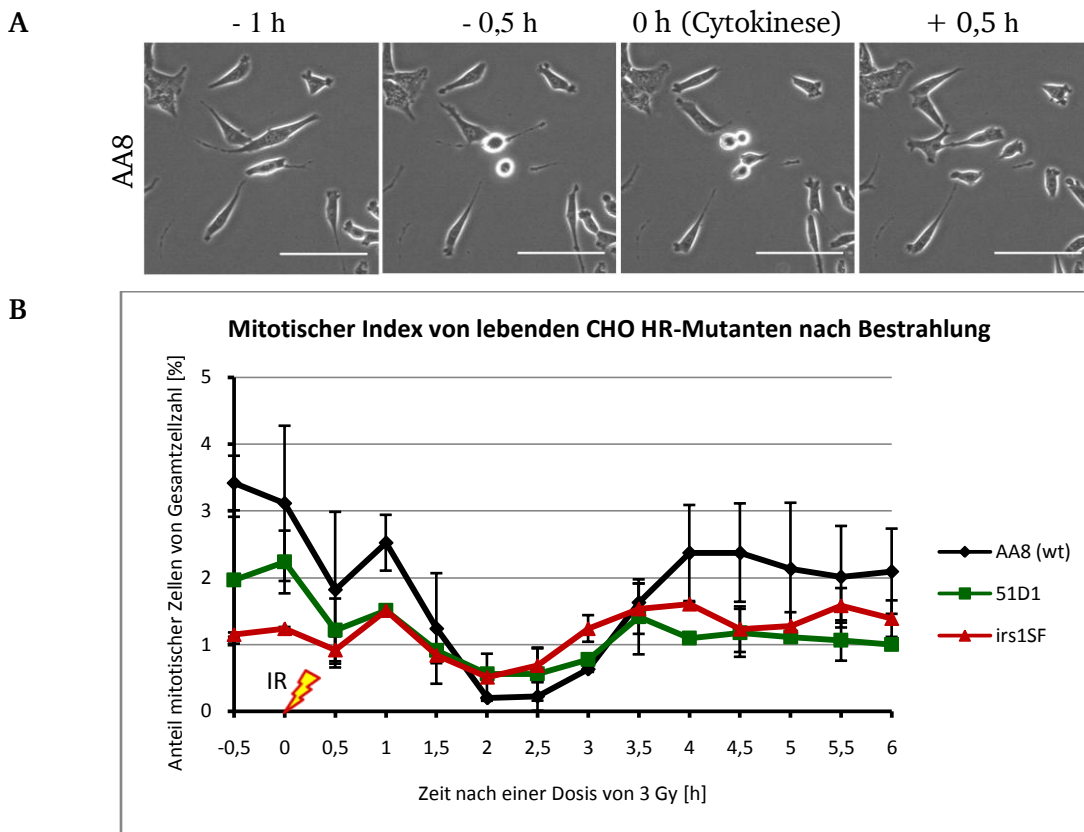


Abbildung 16: Messung des MI von CHO HR-Mutanten und wt-Zellen mittels Lebendzellmikroskopie.

Exponentiell wachsende CHO HR-Mutanten und wt-Zellen wurden mit einer Dosis von 3 Gy bestrahlt. Von den Zellen wurden von 0,5 h vor bis 6 h nach Bestrahlung alle 0,5 h Aufnahmen am Lebendzellmikroskop gemacht und anschließend der MI anhand der Bilder am Computer berechnet.

(A) Exemplarische Aufnahmen mitotischer Zellen am Lebendzellmikroskop zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die angegebenen Zeiten beziehen sich auf die beobachtete Cytokinese, welche als 0-Stundenpunkt definiert wurde. Der Maßstab entspricht 100 μ m.

(B) Graphische Darstellung des MI über die Zeit. Die Datenpunkte zeigen den Mittelwert von 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils $n \geq 2000$ bzw. $n \geq 1180$ analysierten Zellen pro Zelllinie und Experiment. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwerte der beiden Experimente an.

Wie bei den G2/M-Checkpointanalysen in fixierten Zellen zeigt der wt im Vergleich zu den HR-Mutanten im unbestrahlten Zustand ein generell höheres Level an mitotischen Zellen (Abbildung 16 B). Innerhalb der ersten 2 h nach Bestrahlung nimmt die Anzahl an Mitosen bei der wt-Zelllinie AA8 auf nahezu 0 % ab. Etwa 3 h nach Bestrahlung treten wieder Cytokinesen auf, wodurch der MI ansteigt und 4 h nach Bestrahlung sein neues Maximum erreicht. Die HR-Mutanten zeigen einen ähnlichen, jedoch schwächer ausgeprägten Kurvenverlauf. Von einem im Vergleich zum wt niedrigeren MI startend, sinken die MIs beider HR-Mutanten innerhalb von 2 h nach Bestrahlung bis auf ein Minimum von etwa 0,5 %, bevor sie 3 h nach Bestrahlung wieder steigen. Bereits 3,5 h bzw. 4 h nach Bestrahlung erreichen sie ihr neues Maximum.

Auffällig bei allen drei Zelllinien ist ein leichter Anstieg der Kurven 1 h nach Bestrahlung. Dies ist vermutlich auf methodische Probleme während der Versuchsdurchführung zurückzuführen. Sowohl vor als auch nach der Bestrahlung befanden sich die Zellen in einer konstant auf 37°C aufgeheizten Umgebung mit einem CO₂-Gehalt von 5 %. Für die Bestrahlung in der Röntgenröhre mussten die Zellen allerdings für kurze Zeit diese optimalen Umgebungsbedingungen verlassen. Trotz intensiver Bemühungen, diese Zeit zu minimieren, und trotz der Verwendung von Wärmeakkus, die ein Auskühlen der Zellen verhindern sollten, führte diese Störung dennoch zu einer Beeinträchtigung des Zellzyklusverhaltens. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass Zellen, die sich unmittelbar vor der Teilung befanden, die Cytokinese für eine bestimmte Zeit (etwa 30 min) unterbanden. Nach der anschließenden Inkubation unter optimalen Wachstumsbedingungen (37°C, 5 % CO₂) erholten sich die Zellen wieder und die zuvor in der Mitose arretierten Zellen leiteten die Cytokinese ein. Folglich ist 1 h nach der Bestrahlung ein deutlicher Anstieg des MIs zu verzeichnen, obwohl zu dieser Zeit bereits eine strahleninduzierte Abnahme an mitotischen Zellen zu beobachten wäre.

Zusammenfassend bestätigen die Daten der Lebenszellmikroskopie die Ergebnisse der G2/M-Checkpointanalysen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. Unmittelbar nach der Bestrahlung mit 3 Gy wird der G2/M-Checkpoint aktiviert und der MI nimmt sowohl im wt als auch in den HR-Mutanten ab. Während beim wt der MI auf nahezu 0 % sinkt, zeigen die HR-Mutanten einen weniger starken Rückgang. Da bei dem Versuch die Anzahl der Zellteilungen gemessen wurden, bedeutet dies, dass sich bei den HR-Mutanten trotz der G2/M-Checkpointaktivierung weiterhin Zellen teilen. Dies könnte zum Einen auf eine im Vergleich zum wt weniger effiziente Arretierung von Zellen in der G2-Phase hindeuten, zum Anderen könnte die Depletion von HR-Faktoren in den Zellen zu einer verlängerten Mitosedauer führen, weshalb im Vergleich zum wt auch zu späteren Zeiten noch Zellteilungen auftreten. Etwa 3 h nach der

Bestrahlung wird der G2/M-Checkpoint annähernd zeitgleich bei allen Zelllinien wieder aufgelöst und die G2-Zellen in die Mitose entlassen.

4.2 DSB-Reparaturuntersuchungen in HR-defizienten Zelllinien

Nachdem im vorherigen Abschnitt in den CHO-Zelllinien untersucht wurde, zu welchen Zeiten der G2/M-Checkpoint nach Bestrahlung wieder aufgehoben wird, sollte in den folgenden Experimenten analysiert werden, ob zum Zeitpunkt der G2/M-Checkpointaufhebung auch im CHO-Zellsystem die DSB-Reparatur über den Mechanismus der HR erfolgt. Ferner sollte überprüft werden, ob auch in den CHO-Zelllinien eine Insensitivität des G2/M-Checkpoints gegenüber DSBs vorhanden ist, und somit die Möglichkeit für ein Eintreten von G2-Phasezellen mit HR-Intermediaten in die Mitose besteht.

Für diese Untersuchungen wurden in der wt-Zelllinie AA8 sowie in den HR-Mutanten 51D1 und irs1SF DSB-Reparaturkinetiken nach Bestrahlung in der G2-Phase erstellt. Die Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, nach 2 Tagen mit einer Dosis von 3 Gy bestrahlt, nach unterschiedlichen Reparaturzeiten fixiert und mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen phosphoryliertes Histon 2AX (γ H2AX) und DAPI als DNA-Farbstoff angefärbt. Durch die Zugabe des Thymidinanalogons EdU vor der Bestrahlung wurden die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen markiert und später bei der Auswertung ausgeschlossen, da sie im Gegensatz zu den in G2-bestrahlten Zellen in der G2-Phase ein deutlich höheres spontanes Schadenslevel aufweisen und somit das Ergebnis verfälschen würden. Außerdem könnten in der S-Phase andere Reparaturwege eine entscheidende Rolle spielen, jedoch sollte nur die Reparatur in der G2-Phase näher analysiert werden. Die Auswertung erfolgte am Immunfluoreszenzmikroskop. Nach dem Einscannen der Zellen im DAPI-Kanal wurde anhand der DAPI- und EdU-Intensitäten des Zellkerns mit Hilfe der Mikroskopsoftware "MetaCyte" am Computer eine zellzyklusspezifische, graphische Auftrennung der Zellen in Form eines *dot plots* erstellt (Abschnitt 3.3.7.2; Abbildung 14), G2-Phasezellen (EdU-negativ, doppelte DAPI-Intensität) ausgewählt und die Anzahl der γ H2AX-Foci in diesen Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

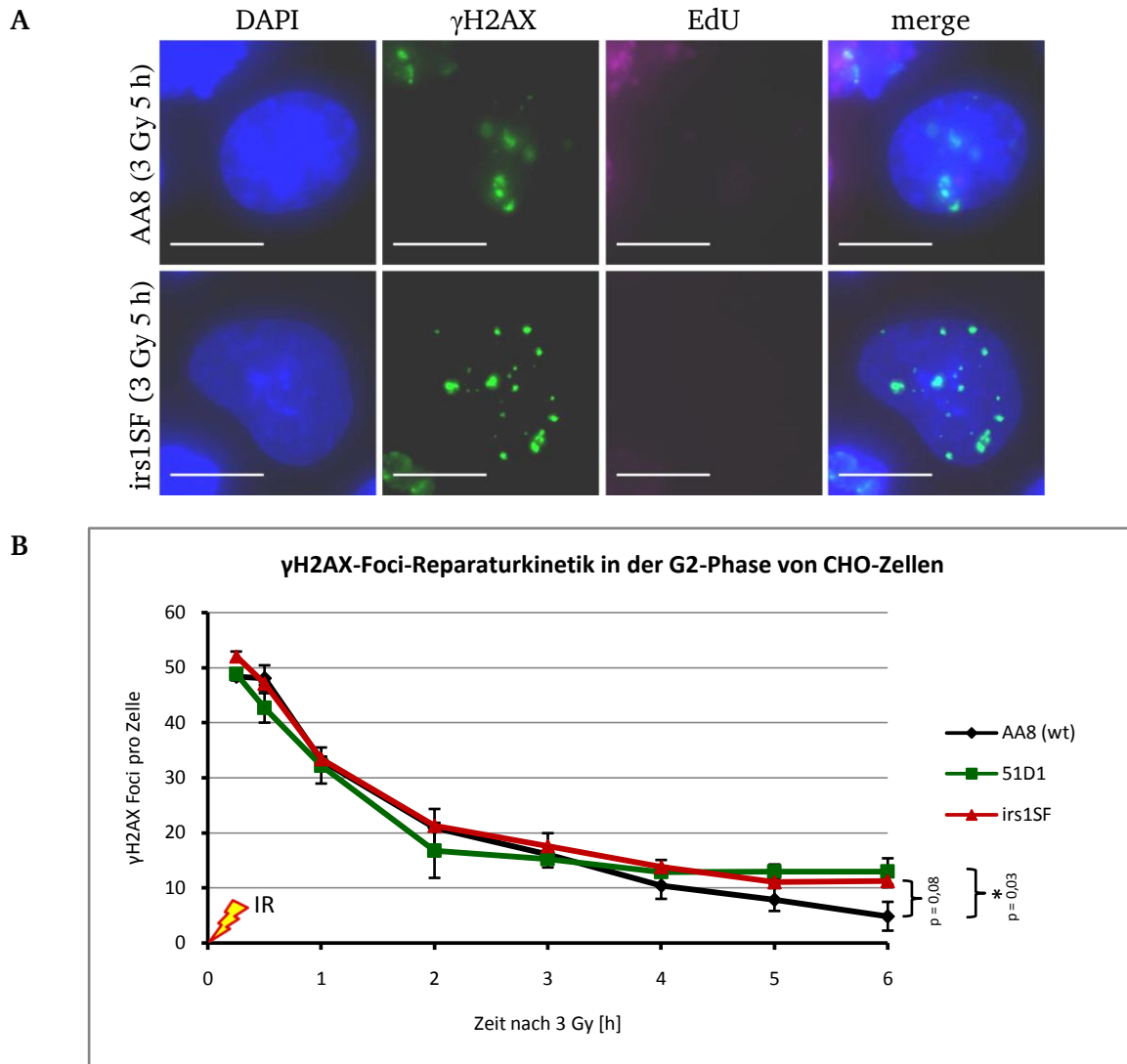


Abbildung 17: γ H2AX-Foci-Reparaturkinetiken von CHO wt-Zellen und HR-Mutanten in der G2-Phase nach Bestrahlung mit 3 Gy.

Exponentiell wachsende Zellen von CHO HR-Mutanten 51D1 und irs1SF sowie AA8 wt-Zellen wurden mit einer Dosis von 3 Gy bestrahlt, nach unterschiedlichen Reparaturzeiten fixiert und mit Hilfe von Fluorochromgekoppelten Antikörpern gegen γ H2AX und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert und bei der Auswertung ausgeschlossen. Die Zellen wurden im DAPI-Kanal am Immunfluoreszenzmikroskop eingescannt und anschließend die γ H2AX-Focianzahl in G2-Phasezellen am Mikroskop manuell ermittelt.

(A) Exemplarische, immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CHO wt-Zellen (AA8) und HR-Mutanten (irs1SF) in der G2-Phase mit γ H2AX-Foci nach Bestrahlung. Der Maßstab entspricht 10 μ m. Blau: DAPI, grün: γ H2AX, magenta: EdU.

(B) Graphische Darstellung der γ H2AX-Foci in G2-Phasezellen über die Zeit. Die Datenpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten von $n \geq 2$ Experimenten mit jeweils $n = 40$ ausgewerteten Zellen/Zeitpunkt. Die Fehlerbalken entsprechen für die Datenpunkte aus $n = 2$ Experimenten der Standardabweichung der Mittelwerte der Experimente bzw. für Datenpunkten aus $n \geq 3$ Experimenten dem Standardfehler der Mittelwerte der Experimente.

Unbestrahlte G2-Phasezellen der wt-Zelllinie AA8 zeigen ein niedriges Hintergrundniveau von etwa 4 γ H2AX-Foci/Zelle, während die beiden HR-Mutanten 51D1 und irs1SF mit etwa 7 bzw. 8 γ H2AX-Foci/Zelle ein leicht erhöhtes Hintergrundniveau aufweisen (Daten nicht gezeigt). 15 min nach der Bestrahlung mit 3 Gy liegt das γ H2AX-Focuslevel nach Abzug des

Hintergrundniveaus bei den HR-Mutanten mit 49 (51D1) bzw. 52 γ H2AX-Foci (irs1SF) auf ähnlich hohem Niveau wie beim wt AA8 (48 Foci) (Abbildung 17). Im weiteren Verlauf nimmt im Zuge der DSB-Reparatur die Anzahl der γ H2AX-Foci beim wt stetig ab. Während dabei im Zeitraum von 15 min bis 2 h nach Bestrahlung eine schnelle Abnahme der Focianzahl zu beobachten ist, sinkt die Anzahl der DSBs zu späteren Zeiten langsamer und liegt nach einer Reparaturzeit von 6 h nur noch geringfügig über dem Kontrollniveau. Zu frühen Zeiten der DSB-Reparatur (15 min - 3 h) zeigen die Graphen der γ H2AX-Foci-Reparaturkinetiken der HR-Mutanten 51D1 und irs1SF einen ähnlichen Verlauf wie der Graph des wt. Zu späten Zeiten der Reparatur weisen die HR-Mutanten allerdings einen Reparaturdefekt auf und das γ H2AX-Focilevel stagniert bei etwa 11 bzw. 13 γ H2AX-Foci/Zelle.

Das Experiment zeigt, dass sich die DSB-Reparatur der CHO-Zelllinien in der G2-Phase in zwei Phasen unterteilen lässt. Während im Rahmen der frühen Reparaturkomponente in den ersten Stunden nach Bestrahlung kein Unterschied im Reparaturverhalten zwischen wt und den HR-Mutanten zu erkennen ist, zeigen die HR-defizienten Zellen während der späten Komponente einen Reparaturdefekt. Diese Ergebnisse sind konsistent mit bisherigen Veröffentlichungen, die eine DSB-Reparatur über den Weg der HR erst zu späten Zeiten nach Bestrahlung in Human- und Mauszellen beschreiben (Beucher et al. 2009).

Vergleicht man die Ergebnisse dieses Versuchs mit denen der G2/M-Checkpointanalysen, so zeigt sich, dass auch in den CHO-Zelllinien zu den Zeiten, zu denen der G2/M-Checkpoint nach Bestrahlung wieder aufgehoben wird und die Zellen in die Mitose entlassen werden, die DSB-Reparatur noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Dass die HR-Mutanten zu diesen Zeiten ein deutlich erhöhtes Bruchlevel zeigen, verdeutlicht, dass bei der wt-Zelllinie AA8 die DSBs noch über den Weg der HR repariert werden. Diese Ergebnisse bekräftigen somit die Annahme, dass G2-bestrahlte Zellen mit HR-Intermediaten in die Mitose eintreten. In den folgenden Experimenten sollten daher die Strukturen der HR-Intermediate in der darauffolgenden Mitose näher charakterisiert werden.

4.3 In der G2-Phase induzierte DNA-Schäden in der Mitose

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass G2-bestrahlte Zellen tatsächlich mit intermediären Reparaturstrukturen der HR in die Mitose eintreten. Diese Strukturen sollten als nächstes genauer charakterisiert werden. Da jedoch eine direkte Visualisierung der jeweiligen HR-Intermediate aus technischen Gründen nicht möglich ist, sollte mit Hilfe von indirekten Verfahren Rückschlüsse auf die Strukturen gezogen werden. Hierzu sollte das DSB-Level von G2-bestrahlten Mitosen des wt AA8 und der HR-Mutanten 51D1 und irs1SF sowohl auf

γ H2AX-Foci- als auch auf chromosomaler Bruchebene ermittelt werden. Unter der Annahme, dass jeder γ H2AX-Focus einen DSB repräsentiert, jedoch, wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt, nicht jeder DSB zu einem chromosomalen Bruch wird (Deckbar et al. 2007; Löbrich et al. 2010; Cornforth und Bedford 1993), könnte das Verhältnis der γ H2AX-Focianzahlen zu den Chromatidbruchleveln möglicherweise Rückschlüsse auf die Strukturen der HR-Intermediate in der Mitose zulassen.

4.3.1 γ H2AX-Focianalysen in der frühen Mitose

Zunächst wurde das DSB-Level in der Mitose nach Bestrahlung in der G2-Phase im wt AA8 sowie in den beiden HR-Mutanten 51D1 und irs1SF anhand des γ H2AX-Focussignals analysiert. Hierfür wurden exponentiell wachsende Zellen mit 3 Gy bestrahlt und 5 h nach Bestrahlung fixiert, da zu diesem Zeitpunkt der G2/M-Checkpoint bereits wieder aufgelöst wurde und ausreichend mitotische Zellen für die Analyse vorhanden sind. Für die Auswertung wurden mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper pH3 und γ H2AX gefärbt, um mitotische Zellen respektive DSBs zu markieren. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in S-Phase befindenden Zellen wurden mit EdU markiert und aus der Auswertung ausgeschlossen. Um die Ergebnisse später mit den chromosomalen Studien vergleichen zu können, wurde das γ H2AX-Focilevel in Metaphasezellen analysiert. Anhand ihres starken pH3-Signals und ihrer charakteristischen Morphologie (Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene, siehe Abbildung 18 A) wurden die Metaphasezellen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop identifiziert und anschließend ihr γ H2AX-Focilevel manuell ermittelt.

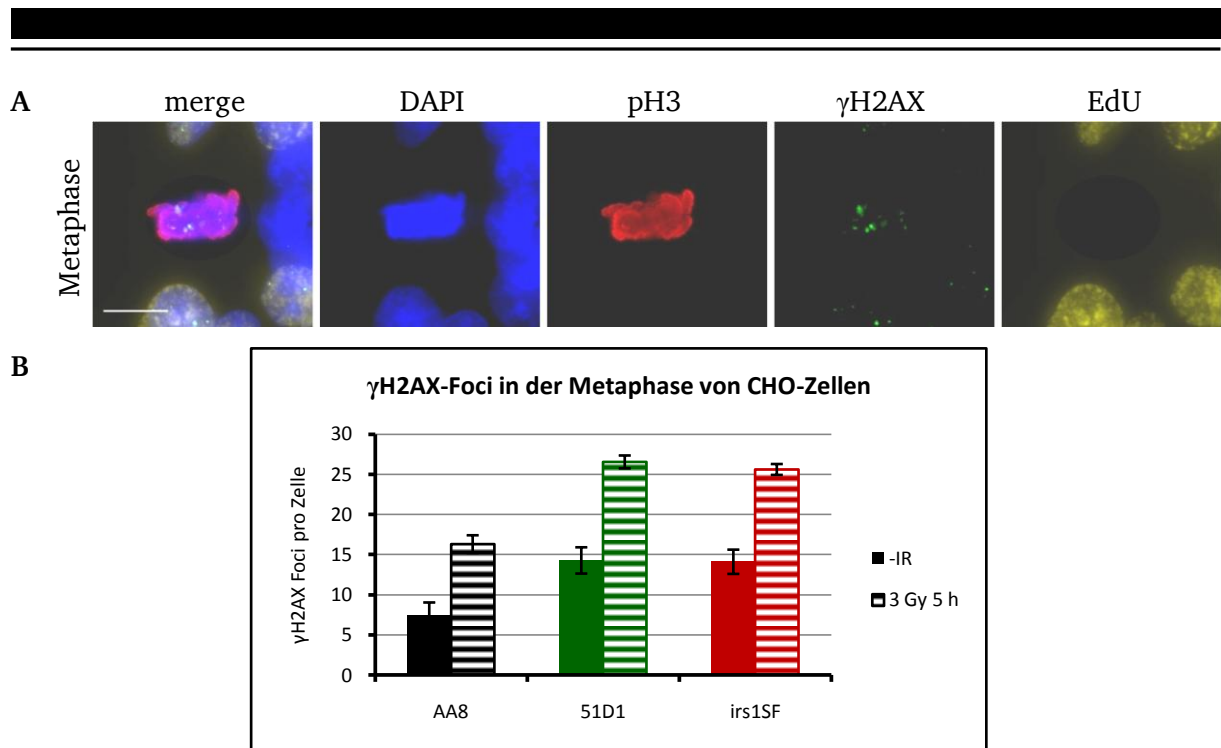


Abbildung 18: γ H2AX-Focilevel in der Metaphase von CHO wt-Zellen und HR-Mutanten nach Bestrahlung in G2. Exponentiell wachsende CHO wt- und HR-defiziente Zellen wurden mit einer Dosis von 3 Gy bestrahlt, nach 5 h fixiert und gegen pH3, γ H2AX und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Auswertung ausgeschlossen. Die Zellen wurden am Immunfluoreszenzmikroskop im DAPI-Kanal eingescannt und die γ H2AX-Focianzahl in G2-bestrahlten Metaphasezellen manuell am Mikroskop ermittelt.

(A) Exemplarische, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer unbestrahlten Metaphasezelle (AA8) mit γ H2AX-Foci. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

(B) Graphische Darstellung der γ H2AX-Focilevel von G2-bestrahlten Metaphasen. Die Datenpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten aus 4 Experimenten mit jeweils n = 40 ausgewerteten Metaphasen/Bedingung. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte von 4 Experimenten.

Auf γ H2AX-Fociebene weist der wt AA8 im unbehandelten Zustand in Metaphasezellen etwa 7 γ H2AX-Foci/Zelle auf (Abbildung 18 B). Nach Bestrahlung zeigen in der G2-Phase bestrahlte Metaphasezellen einen Anstieg auf etwa 16 γ H2AX-Foci/Zelle. Die HR-defizienten Zelllinien 51D1 und irs1SF zeigen bereits im unbestrahlten Zustand in den Metaphasezellen ein etwa doppelt so hohes Level an γ H2AX-Foci wie unbestrahlte wt-Zellen. Nach Bestrahlung steigt die Anzahl an γ H2AX-Foci auf etwa 25 bzw. 26 γ H2AX-Foci/Zelle und damit auf ein deutlich höheres Niveau als beim wt.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so zeigen alle Zelllinien auf γ H2AX-Fociebene einen strahleninduzierten Anstieg der DSB-Level in der Metaphase, wobei dieser bei den HR-Mutanten etwas stärker ausfällt als beim wt. Darüber hinaus weisen die HR-Mutanten bereits im unbestrahlten Zustand hohe Focilevel auf. Somit deuten die Ergebnisse auf einen Reparaturdefekt bei den HR-Mutanten hin.

4.3.2 Untersuchungen von chromosomalen Brüchen in der frühen Mitose

In diesem Versuchsansatz sollte das DSB-Level von in der G2-Phase bestrahlten Mitosen auf chromosomaler Ebene untersucht und anschließend mit den zuvor ermittelten Daten der γ H2AX-Focianalysen in der Mitose verglichen werden, um ggf. Rückschlüsse auf die Morphologie der DSBs in der Mitose ziehen zu können. Hierfür wurden die gleichen Zelllinien und Versuchsbedingungen wie bei den DSB-Analysen in der Mitose auf γ H2AX-Fociebene gewählt.

Exponentiell wachsende Zellen des wt AA8 und der HR-Mutanten 51D1 und irs1SF wurden mit 3 Gy bestrahlt, die Chromosomen ohne vorherige Zugabe des Spindelgiftes Colcemid nach einer Reparaturzeit von 5 h fixiert und auf Objektträgern gespreitet. Mit Hilfe der Giemsa-Färbung wurden die Chromosomen gefärbt, Bilder der Chromosomenspreitungen am Durchlichtmikroskop aufgenommen und anschließend das chromosomale Bruchlevel in den Chromosomenspreads (Metaphasen) manuell am Computer bestimmt. Während der Metaphase ist die Chromosomenkondensation maximal, so dass sich zu diesem Zeitpunkt sowohl die einzelnen Schwesterchromatiden, als auch chromosomale Brüche gut erkennen lassen (Abbildung 19 A).

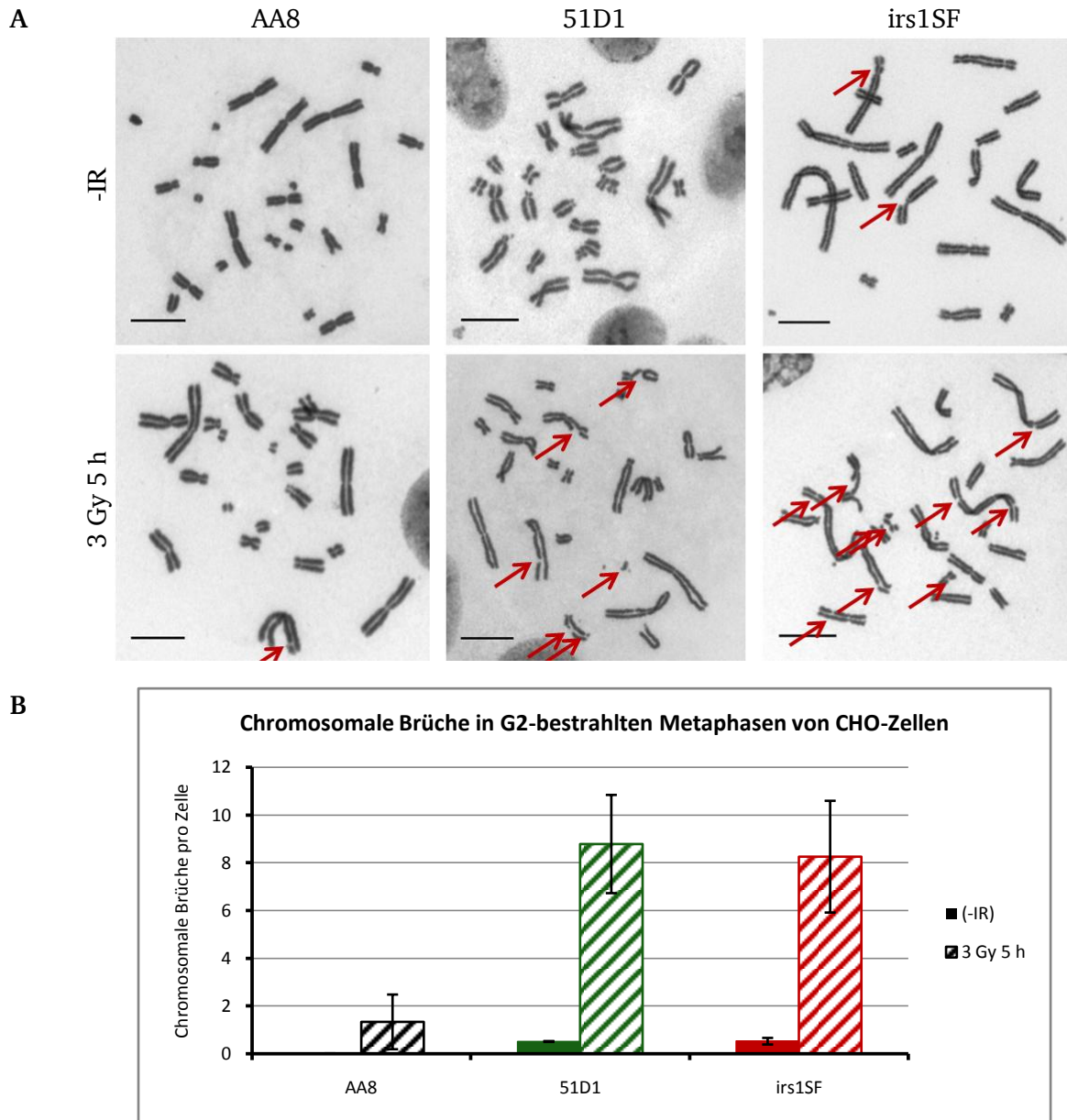


Abbildung 19: Chromosomale Brüche in der Metaphase von CHO wt-Zellen und HR-Mutanten nach Bestrahlung in G2.

Exponentiell wachsende CHO wt-Zellen und HR-Mutanten wurden mit 3 Gy bestrahlt und nach 5 h fixiert. Die Chromosomen wurden auf Objektträgern gespreitet und mittels Giemsa gefärbt. Am Durchlichtmikroskop wurden Aufnahmen der Chromosomen angefertigt und am Computer die Anzahl chromosomaler Brüche in den Metaphasen manuell bestimmt.

(A) Exemplarische, durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Metaphase-Chromosomen mit Chromatidbrüchen (rote Pfeile). Der Maßstab entspricht 10 μm .

(B) Graphische Darstellung der chromosomalen Brüche von G2-bestrahlten Metaphasespreitungen. Die Datenpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten von 2 Experimenten mit jeweils $n = 40$ ausgewerteten Metaphasen/Bedingung. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte von 2 Experimenten dar.

Der wt AA8 weist im unbestrahlten Zustand nahezu keine Chromosomenbrüche in der Metaphase auf (Abbildung 19 B). Nach einer Dosis von 3 Gy in der G2-Phase und einer Reparaturzeit von 5 h steigt das Bruchlevel auf etwa 1,4 Brüche/Zelle an. Die HR-Mutanten

51D1 und irs1SF zeigen in den unbestrahlten Kontrollen jeweils etwa 0,5 chromosomale Brüche/Zelle. Im Gegensatz zum wt steigt die Anzahl an chromosomalen Brüchen nach Bestrahlung jedoch massiv auf über 8 Brüche/Zelle an. Somit ist bei allen Zelllinien ein strahleninduzierter Anstieg des chromosomalen Bruchlevels zu beobachten, der jedoch bei den HR-Mutanten wesentlich ausgeprägter ist als beim wt.

Vergleicht man die Daten der chromosomalen Studie mit den Ergebnissen der DSB-Analysen auf γ H2AX-Fociebene, so ist mit beiden Analysemethoden bei allen Zelllinien ein strahleninduzierter Anstieg der Bruchlevel zu beobachten. Darüber hinaus bestätigen die Ergebnisse der chromosomalen Bruchanalysen die Hinweise der γ H2AX-Focianalysen auf einen Reparaturdefekt bei den HR-Mutanten. Der strahleninduzierte Anstieg der chromosomalen Brüche fällt erwartungsgemäß beim wt AA8 mit $1,3 \pm 1,2$ Brüche/Zelle deutlich geringer aus als der Anstieg der γ H2AX-Focizahlen ($8,9 \pm 2,8$ Foci/Zelle). Dies ist konsistent mit den Beobachtungen früherer Arbeiten, die postulieren, dass nicht jeder γ H2AX-Focus auch als chromosomaler Bruch identifiziert werden kann (Deckbar et al. 2007; Löbrich et al. 2010; Cornforth und Bedford 1993). Interessanterweise entspricht die Anzahl der strahleninduzierten γ H2AX-Foci bei den HR-Mutanten 51D1 und irs1SF mit $12,3 \pm 2,4$ bzw. $11,5 \pm 2,2$ Foci/Zelle in etwa der Anzahl der strahleninduzierten chromosomalen Brüche ($8,3 \pm 2,1$ bzw. $7,7 \pm 2,5$ Brüche/Zelle). Dies deutet darauf hin, dass nahezu jeder DSB auch ein Chromatidbruch ist. Die Ergebnisse könnten einen ersten Hinweis darauf liefern, dass wt-Zellen mit intermediären Strukturen der HR wie z.B. D-Loops oder Holliday Junctions in die Mitose eintreten. Diese Reparaturintermediate könnten die Bruchstrukturen stabilisieren und somit deren Umwandlung in Chromatidbrüche im Zuge der Chromosomenkondensation während der Mitose verhindern. Im Gegensatz dazu könnten die DSBs bei den Zelllinien 51D1 und irs1SF aufgrund ihrer HR-Defizienz nicht ausreichend stabilisiert werden, wodurch diese HR-defizienten Zelllinien auf chromosomaler Ebene ähnlich hohe Bruchlevel zeigen wie auf γ H2AX-Fociebene.

Aus dieser Annahme heraus entwickelte sich die Frage, was mit diesen intermediären Reparaturstrukturen der HR passiert, wenn sich die Chromatiden in der Anaphase teilen. Die Überkreuzungen der Chromatiden bei diesen Strukturen könnten zu Problemen bei der Segregation der Schwesterchromatiden führen und eine Quelle für die Generierung möglicher neuer Brüche darstellen. Aus diesem Grund sollte in dem folgenden Kapitel das DSB-Level in Hinblick auf die Chromatidentrennung während der Anaphase genauer untersucht werden.

4.3.3 γ H2AX-Focianalysen in der späten Mitose

Im Folgenden sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die Trennung der Chromatiden während der Anaphase auf das Bruchlevel der Zellen hat und ob eine mögliche Existenz von strahleninduzierten HR-Intermediaten dieses beeinflusst. Dazu wurde zunächst das DSB-Level auf γ H2AX-Fociebene unmittelbar nach der Chromatidenteilung (späte Anaphase) quantifiziert und mit den Werten der Metaphase verglichen. Hierfür wurden exponentiell wachsende CHO wt- und HR-defiziente Zellen mit 3 Gy bestrahlt, nach einer Reparaturzeit von 5 h fixiert und anschließend mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper gegen pH3, γ H2AX und die DNA (DAPI) gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert und anschließend von der Auswertung ausgeschlossen. Schließlich wurde das γ H2AX-Focilevel in Meta- und Anaphasezellen bestimmt. Metaphasen wurden anhand der pH3-Intensität sowie der Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene identifiziert, Anaphasen anhand ihrer hohen pH3-Intensität und den sich bereits trennenden Chromatiden (Abbildung 20 A).

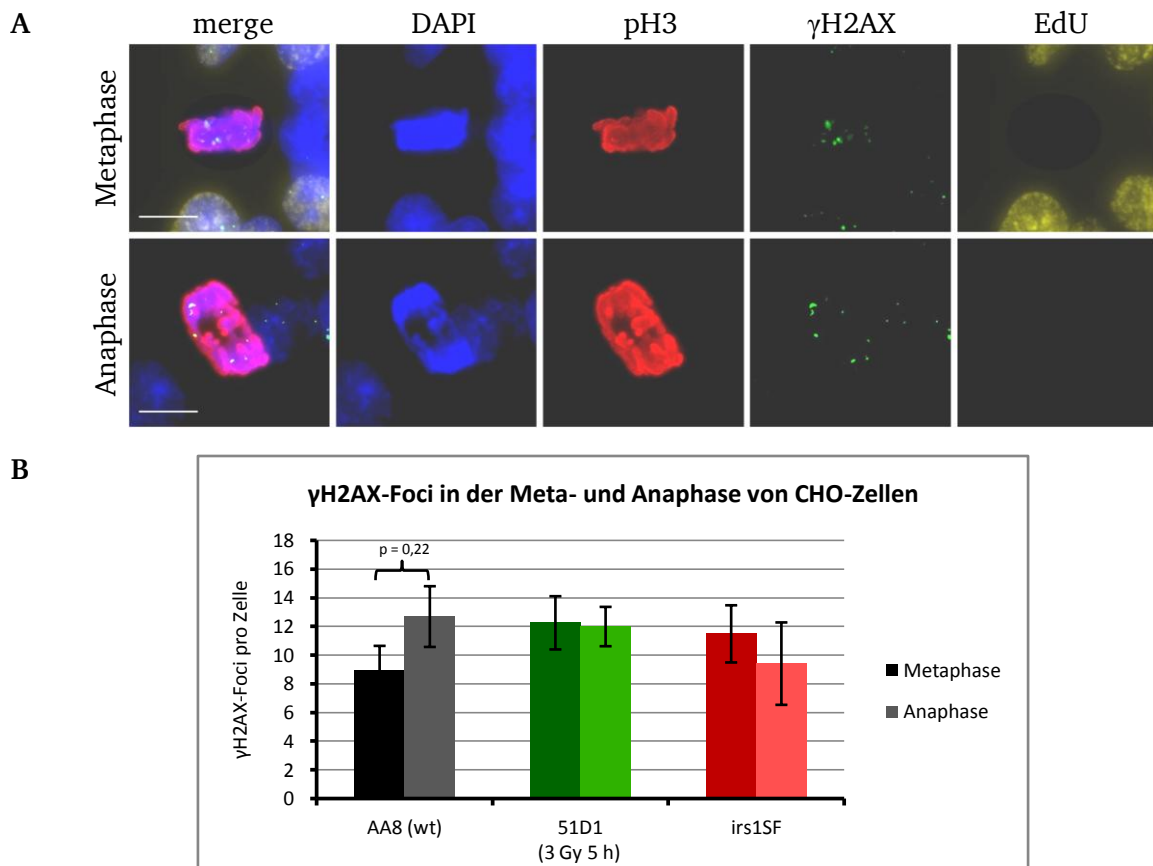


Abbildung 20: γ H2AX-Focilevel in Meta- und Anaphase von CHO wt-Zellen und HR-Mutanten nach Bestrahlung in G2.

Exponentiell wachsende CHO wt- und HR-defiziente Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt, nach 5 h fixiert und mit Antikörpern gegen pH3, γ H2AX und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Auswertung ausgeschlossen. Anschließend wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop im DAPI-Kanal eingescannt und das γ H2AX-Focilevel in G2-bestrahlten Meta- und Anaphasezellen manuell ausgewertet.

(A) Exemplarische, fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer unbestrahlten Meta- und einer unbestrahlten Anaphasezelle (AA8) mit γ H2AX-Foci. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

(B) Graphische Darstellung der γ H2AX-Focilevel in Meta- und Anaphasezellen nach Bestrahlung in G2. Die Datenpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten von 4 Experimenten mit jeweils n = 40 ausgewerteten Meta- und Anaphasezellen. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte von 4 Experimenten wider.

Der CHO wt AA8 zeigt in der Metaphase nach 3 Gy ein Level von etwa 9 γ H2AX-Foci/Zelle (strahleninduziert) (Abbildung 20 B). Dieses steigt in der Anaphase auf etwa 13 γ H2AX-Foci an. Die beiden HR-defizienten Zelllinien 51D1 und irs1SF weisen in der Metaphase ein im Vergleich zum wt erhöhtes DSB-Level von etwa 12 γ H2AX-Foci auf. Im Gegensatz zum wt ist bei den HR-Mutanten jedoch kein strahleninduzierter Anstieg der γ H2AX-Focizahl von Meta- zu Anaphase zu verzeichnen.

Die Ergebnisse legen nahe, dass beim wt AA8 im Zuge der Schwesterchromatidentrennung während der Anaphase neue DSB entstehen. Da dieser Effekt bei den HR-Mutanten nicht zu beobachten ist, könnte es sich hierbei um einen HR-abhängigen Prozess handeln und auf die

Existenz von HR-Intermediaten, wie D-Loops und Holliday Junctions, in der Mitose hindeuten. Diese Chromatin-Verwicklungen könnten zu Problemen bei der Chromatidentrennung und dadurch zur Generierung neuer DSBs während der Anaphase führen.

4.3.4 Untersuchungen von chromosomalen Brüchen in der späten Mitose

In diesem Experiment sollten die Ergebnisse der γ H2AX-Focianalysen (Abbildung 20), dass durch einen HR-abhängigen Prozess in G2-bestrahlten Anaphasezellen im Zuge der Chromatidentrennung neue DSBs entstehen, verifiziert werden. Hierfür sollte im Rahmen von chromosomalen Studien das Chromatidbruchlevel in Anaphasezellen von CHO wt-Zellen und HR-Mutanten nach Bestrahlung in der G2-Phase ermittelt werden.

Die Auswertung erfolgte anhand der in Kapitel 4.3.2 erstellten Präparate. Dafür wurden exponentiell wachsende Zellen des wt AA8 und der HR-Mutanten 51D1 und irs1SF mit 3 Gy bestrahlt, die Chromosomen nach einer Reparaturzeit von 5 h fixiert, auf Objektträgern gespreitet und mittels Giemsa gefärbt. Anschließend wurden von den Chromosomenspreitungen am Durchlichtmikroskop Aufnahmen angefertigt und das Chromatidbruchlevel in den Anaphasen manuell am Computer ermittelt. Da eine Differenzierung zwischen Anaphase und Telophase methodenbedingt nicht möglich war, wurden sämtliche Chromosomenspreitungen mit einem einzelnen Chromosomensatz als Anaphase deklariert ausgewertet. Während die Chromatidbrüche in Metaphase-Chromosomen leicht zu identifizieren sind, muss das Bruchlevel der Anaphase aufgrund des einfachen Chromosomensatzes über die Anzahl der Chromatidfragmente berechnet werden. Dementsprechend ergibt sich die Anzahl der strahleninduzierten Brüche aus der Differenz der Anzahl der Fragmente nach Bestrahlung und der Fragmentanzahl der unbestrahlten Kontrolle.

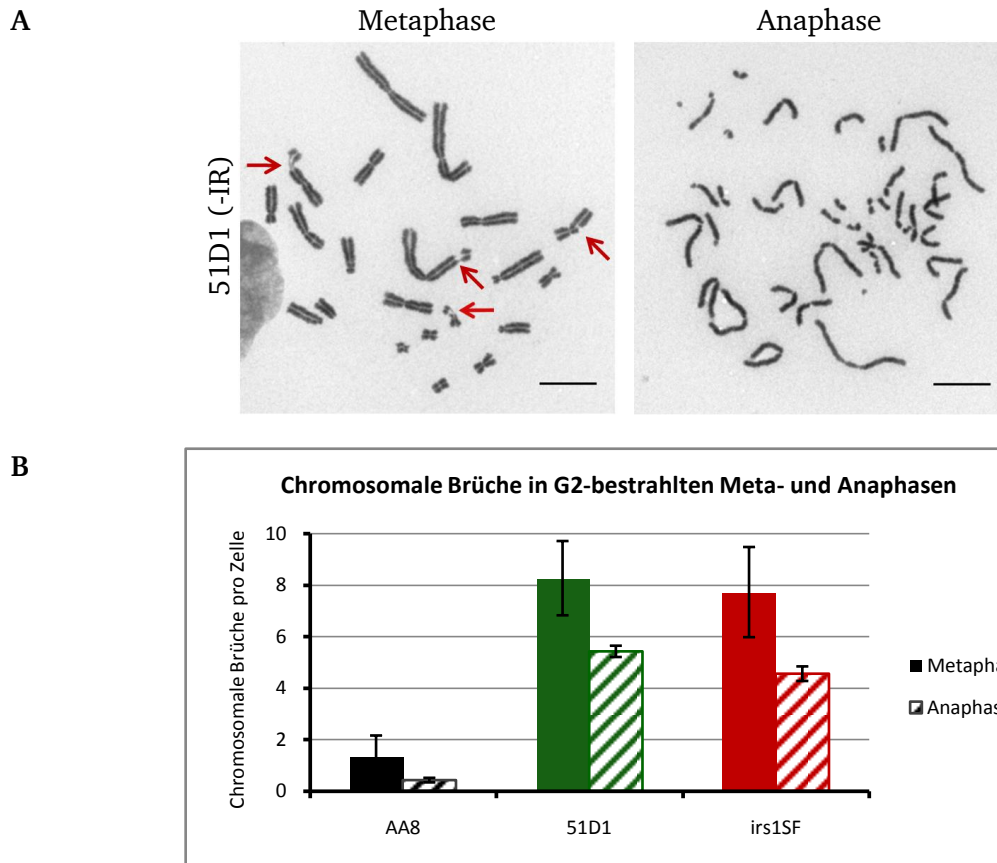


Abbildung 21: Chromosomale Brüche in der Meta- und Anaphase von CHO wt-Zellen und HR-Mutanten nach Bestrahlung in G2.

Die Auswertung erfolgte anhand der in Kapitel 4.3.2 erstellten Präparate. Dafür wurden exponentiell wachsende CHO wt-Zellen und HR-Mutanten mit 3 Gy bestrahlt und nach 5 h fixiert. Anschließend wurden die Chromosomen auf Objektträgern gespreitet, mittels Giemsa gefärbt und am Durchlichtmikroskop Bilder aufgenommen.

(A) Exemplarische, durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Metaphase- und Anaphase-Chromosomen mit Chromatidbrüchen (rote Pfeile). Der Maßstab entspricht 10 μm .

(B) Graphische Darstellung der chromosomalen Brüche von G2-bestrahlten Metaphase- und Anaphase-Spreitungen. Die Chromatidbruchlevel von Metaphasen und Anaphasen wurden manuell am Computer bestimmt. Alle Chromosomen-Spreitungen mit einem einfachen Chromosomensatz wurden als Anaphase deklariert, da methodenbedingt keine Unterscheidung zwischen Ana- und Telophase möglich war. Aufgrund des einfachen Chromosomensatzes wurde die Anzahl der strahleninduzierten Chromatidbrüche in den Anaphase-Chromosomen über die Differenz der Chromatidfragmentanzahl nach der Bestrahlung und der unbestrahlten Kontrolle errechnet. Zum Vergleich sind im Graphen zusätzlich die Chromatidbruchlevel der in G2-bestrahlten Metaphasen (Abbildung 19) nach Abzug der unbestrahlten Kontrolle aufgeführt. Die Datenpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten von 2 Experimenten mit jeweils $n = 40$ ausgewerteten Meta- und Anaphasezellen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte von 2 Experimenten dar.

Um die Ergebnisse dieses Versuchs mit den Chromatidbruchleveln der G2-bestrahlten Metaphasen (Abbildung 19) vergleichen zu können, sind im Graphen zusätzlich die Bruchlevel der Metaphasen nach Abzug der unbestrahlten Kontrollen aufgeführt. Nach Bestrahlung in der G2-Phase zeigen die Anaphase-Chromosomen des wt AA8 mit etwa 0,4 Chromatidbrüchen/Zelle ein geringeres Bruchlevel als Metaphase-Chromosomen (Abbildung 21 B). Im Vergleich zum wt weisen die HR-Mutanten 51D1 und irs1SF in der Anaphase mit jeweils etwa 5 Brüchen/Zelle einen Reparaturdefekt auf. Wie beim wt liegt das Chromatidbruchlevel beider HR-Mutanten unter dem Niveau der jeweiligen Metaphasen.

Vergleicht man die Ergebnisse mit den Beobachtungen der γ H2AX-Focianalysen (Abbildung 20), so konnte in G2-bestrahlten wt-Zellen der Anstieg des DSB-Levels von der Metaphase zur Anaphase auf chromosomaler Ebene nicht bestätigt werden, während die Daten der HR-Mutanten konsistent mit den Beobachtungen der Focianalysen sind und sowohl auf chromosomaler Ebene, als auch auf γ H2AX-Fociebene kein Anstieg des DSB-Levels von Metaphase zur Anaphase aufweisen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass beim wt während der Chromatidentrennung in der Anaphase keine neuen DSBs generiert werden, sondern dass es sich dabei lediglich um eine HR-abhängige Ausbreitung des H2AX-Phosphorylierungssignals handelt.

Anhand der bisher gewonnenen Ergebnisse entwickelte sich die Hypothese, dass in G2-bestrahlte Zellen mit unreparierten Brüchen in die Mitose laufen. Zu den Zeiten zu denen der G2/M-Checkpoint nach Bestrahlung wieder aufgehoben wird und G2-Zellen in die Mitose entlassen werden, ist die Reparatur der DSBs über den Weg der HR noch nicht abgeschlossen. Folglich befinden sich die DSBs in der Prozessierung innerhalb eines Zwischenschrittes der HR. Bei diesen intermediären Strukturen der HR könnte es sich um D-Loops oder Holliday Junctions handeln, welche die DSBs stabilisieren und deren Umwandlung in Chromatidbrüche im Zuge der Chromosomenkondensation während der Mitose verhindern. Gleichzeitig kommt es bei der Ausbildung solcher HR-Strukturen im Zuge der Homologiesuche und des Strangaustausches zu einer temporären Annäherung der beiden Schwesterchromatiden nahe der Bruchregion. Aufgrund der räumlichen Nähe könnte das Phosphorylierungssignal (γ H2AX) des geschädigten Stranges auf den intakten Schwesterstrang übertragen werden. Während der Metaphase liegen die Chromatiden so nah beieinander, dass aufgrund des limitierten Auflösungsvermögens des Immunfluoreszenzmikroskops eine mögliche Phosphorylierungsübertragung auf das Schwesterchromatid nicht als Doppelfocus zu beobachten ist und während der Metaphase nur ein einzelner γ H2AX-Focus zu sehen ist. Erst wenn die beiden Schwesterchromatiden nach der Chromatidentrennung in der Anaphase weit genug auseinander liegen, kann der auf den intakten Strang übertragene γ H2AX-Focus als separater γ H2AX-Focus identifiziert werden. Dies würde den Anstieg der γ H2AX-Focianzahl beim wt von Meta- zu Anaphase erklären.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden im weiteren Verlauf der Arbeit zwei neue Forschungsschwerpunkte gesetzt. Zum Einen sollte die Hypothese der Phosphorylierungsübertragung näher untersucht werden, zum Anderen die weitere Prozessierung der HR-Intermediate in der Mitose in Hinblick auf die Chromatidentrennung während der Anaphase. Dabei war von besonderem Interesse, ob die intermediären Strukturen der HR vor der

Chromatidentrennung rechtzeitig aufgelöst werden, und somit eine fehlerfreie Trennung der Chromatiden sichergestellt wird, oder ob die HR-Intermediate vor der Anaphase nicht aufgelöst werden und es zu einem Auseinanderreißen der Strukturen kommt. Dies würde zu komplexen Brüchen führen und hätte ein erhöhtes DSB-Level in den darauffolgenden Zellzyklusphasen zur Folge.

4.3.5 γ H2AX-Focianalysen in Chromosomenspreitungen

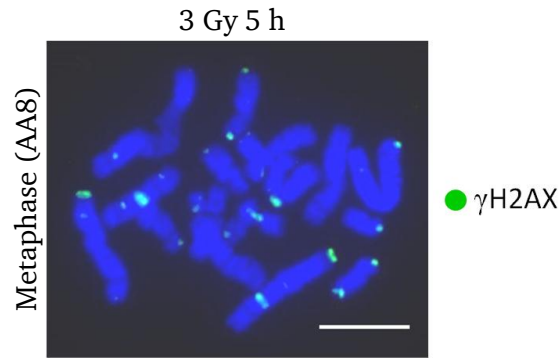
Um das in Kapitel 4.3.4 beschriebene Modell der Phosphorylierungsübertragung genauer untersuchen zu können, sollte zunächst analysiert werden, ob der von der Metaphase zur Anaphase hin beobachtete γ H2AX-Focianstieg durch eine Übertragung der H2AX-Phosphorylierung von der geschädigten auf die ungeschädigte Chromatide zustande kommt und ob es sich dabei um einen HR-abhängigen Prozess handelt. Sofern es im Zuge der Homologiesuche und Stranginvasion und der damit verbundenen Ausbildung von HR-Intermediaten (D-Loops, Holliday Junctions) aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Schwesterchromatiden zu einer Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals käme, wäre folglich im wt AA8 am Immunfluoreszenzmikroskop ein γ H2AX-Doppelfoci zu erwarten. Im Gegensatz dazu finden bei den HR-defizienten Zelllinien 51D1 und irs1SF keine Homologiesuche und kein Strangaustausch statt. Folglich kommt es hier im Zuge der DSB-Reparatur auch nicht zu einer räumlichen Annäherung der beiden Schwesterchromatiden, wodurch auch keine Übertragung des Phosphorylierungssignals stattfindet. Dementsprechend wären für die beiden HR-defizienten Zelllinien keine Doppelfoci zu erwarten.

Da eine Differenzierung zwischen einzelnen und paarigen γ H2AX-Foci in fixierten Zellen anhand der bisher angewandten Methode der γ H2AX-Focianalyse aufgrund einer zu geringen Auflösung der vorhandenen Fluoreszenzmikroskope nicht möglich war, wurden die Methoden der γ H2AX-Focifärbung und der Chromosomenspreitung miteinander kombiniert. Dies sollte eine genaue Lokalisation der einzelnen bzw. paarigen γ H2AX-Foci auf den klar voneinander unterscheidbaren Chromatiden ermöglichen. Um die Immunfluoreszenzfärbung mit der Chromosomenstudie kombinieren zu können, wurde zunächst eine neue Methode in unserem Labor etabliert. Nach der Spreitung mitotischer Chromosomen auf Objektträgern, wurden die Chromosomen fixiert und für die Fluorochrom-gekoppelte Antikörperfärbung gegen γ H2AX und die DNA (DAPI) vorbereitet. Dabei wurde das nach Cesare et al. beschriebene Protokoll verändert und für die hier relevanten Fragestellungen optimiert (Cesare et al. 2009). Anschließend wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der gespreiteten Metaphasen angefertigt und am Computer manuell ausgewertet.

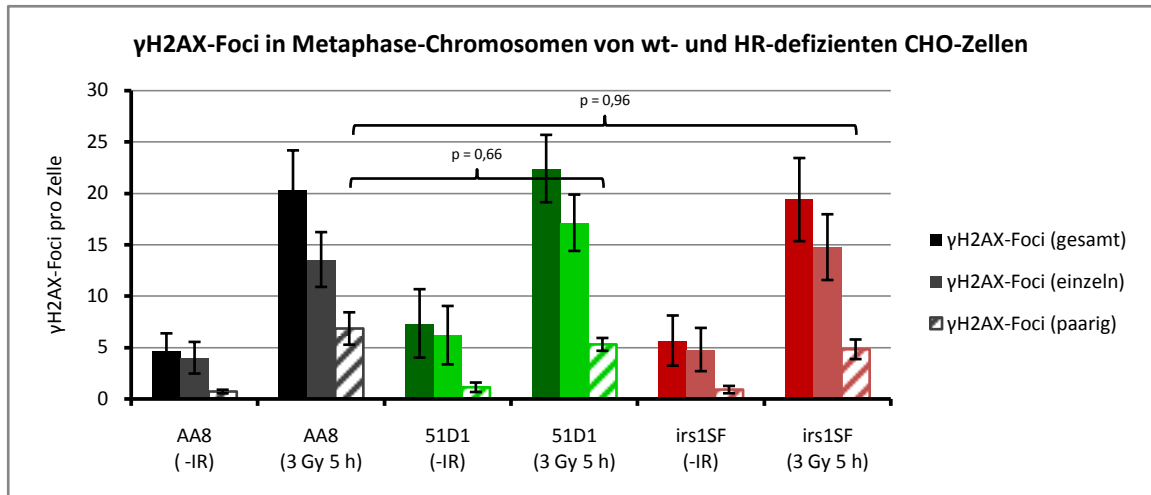
4.3.5.1 γ H2AX-Foci Analysen in mitotischen Chromosomen von CHO-Zellen

Um zu überprüfen, ob eine mögliche Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals des geschädigten Stranges auf das intakte Schwesterchromatid während der HR erfolgt, wurden immunfluoreszenzmikroskopische γ H2AX-Focianalysen auf mitotischen Spreitungen durchgeführt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit den vorherigen Experimenten wurden für diesen Versuch dieselben Versuchsbedingungen gewählt wie bei den γ H2AX- bzw. Chromosomenstudien. Exponentiell wachsende CHO wt- und HR-defiziente Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt, die Chromosomen nach 5 h auf Objektträgern gespreitet und fixiert. Mit Hilfe Fluorochrom-gekoppelter Antikörper gegen γ H2AX wurden die Chromosomen sowie die DNA mit DAPI gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Analyse ausgeschlossen. Nach der Aufnahme der mitotischen Spreitungen wurden die Bilder manuell am Computer ausgewertet. Dabei wurden das γ H2AX-Focilevel sowie die Anzahl der Chromosomen in G2-bestrahlten Metaphasen bestimmt. Wie auch bei den chromosomalen Studien (Kapitel 4.3.2) wurden die γ H2AX-Focianalysen in der Metaphase durchgeführt, da zu dieser Phase die Kondensierung der Chromosomen maximal ist und die beiden Schwesterchromatiden klar voneinander zu unterscheiden sind. Dementsprechend ließ sich ein γ H2AX-Focus auf einem Chromatid eindeutig von einem paarig auftretenden γ H2AX-Doppelfocus auf beiden Schwesterchromatiden differenzieren (Abbildung 22 A). Neben der Gesamtzahl der γ H2AX-Foci wurden die γ H2AX-Foci entsprechend ihrer Erscheinungsform (einzeln/paarig) sowie ihrer Position auf dem Chromosom (mittig/enständig) kategorisiert. Bei den 6 unabhängig durchgeführten Versuchen war eine starke Varianz der Absolutwerte zu erkennen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich der Anteil von einzeln/paarig auftretenden γ H2AX-Foci an der Gesamtfocianzahl berechnet. Die erhaltenen Daten konnten mit den Ergebnissen der früheren γ H2AX-Foci- und Chromatidbruchanalysen verglichen werden.

A



B



C

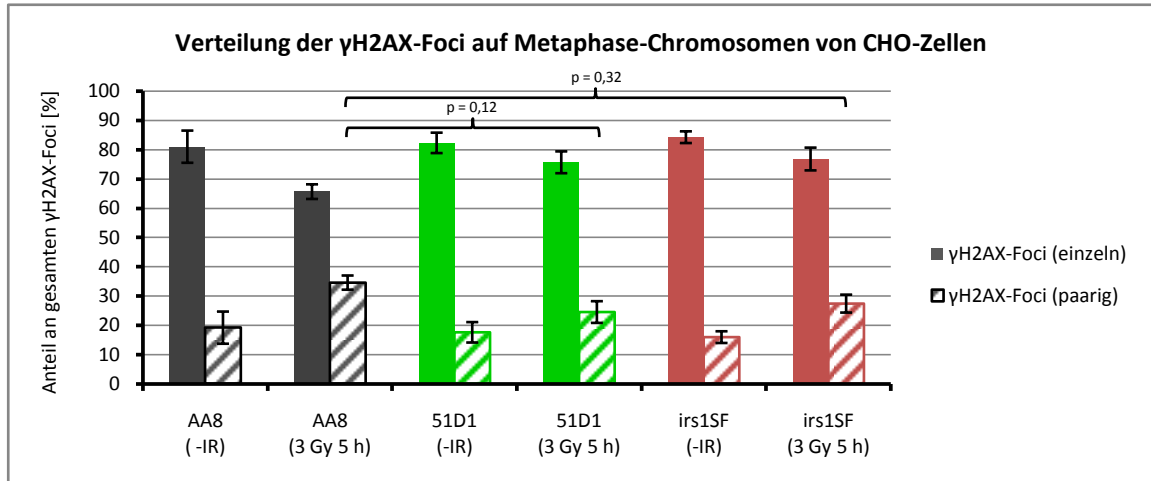


Abbildung 22: γH2AX-Focianalysen in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen in CHO wt-Zellen und HR-Mutanten.

Exponentiell wachsende CHO wt- und HR-defiziente Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt, die Chromosomen nach einer Reparaturzeit von 5 h auf Objektträgern gespreitet, fixiert und gegen γH2AX und die DNA (DAPI) gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Auswertung ausgeschlossen. Von den Chromosomen wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht und anschließend das γH2AX-Focilevel in Metaphase-Chromosomen am Computer ermittelt.

(A) Exemplarische, immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer in G2-bestrahlten, gespreiteten Metaphase mit γH2AX-Foci. Der Maßstab entspricht 10 μm.

(B+C) Graphische Darstellung der γH2AX-Absolutwerte (B) und des Verhältnisses von einzelnen und paarigen γH2AX-Foci (C) in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen. Die Datenpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten von $n \geq 5$ Experimenten mit insgesamt $n \geq 154$ ausgewerteten Metaphasespreitungen pro Bedingung. Die Fehlerbalken spiegeln den Standardfehler der Mittelwerte von $n \geq 5$ Experimenten wider.

Im unbestrahlten Zustand zeigen die Metaphasespreitungen des wt AA8 etwa 5 γ H2AX-Foci/Zelle, wobei die paarig auftretenden γ H2AX-Foci nur einen geringen Anteil von etwa 20 % ausmachen (Abbildung 22 B + C). 5 h nach Bestrahlung steigt die Gesamtzahl an γ H2AX-Foci auf etwa 20 γ H2AX-Foci/Zelle an, wobei sich dabei der Anteil an γ H2AX-Doppelfoci auf etwa 35 % erhöht. Auch in den HR-Mutanten 51D1 und irs1SF ist ein strahleninduzierter Anstieg der γ H2AX-Focizahlen zu verzeichnen. Im Vergleich zum wt zeigen die beiden HR-Mutanten 51D1 und irs1SF bei den γ H2AX-Absolutwerten sowohl im unbestrahlten Zustand als auch nach einer Dosis von 3 Gy keine signifikanten Unterschiede und die Focizahlen bewegen sich im Rahmen der jeweiligen Fehlerbalken. Jedoch zeigen beide HR-defizienten Zelllinien mit einem Doppelfocianteil von etwa 25 % von der Gesamtfocianzahl einen leicht geringeren Anteil an paarig auftretenden γ H2AX-Foci als der wt.

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass die beiden HR-Mutanten in diesem Versuchsansatz keinen Reparaturdefekt zeigen und ähnlich hohe γ H2AX-Absolutfocizahlen aufweisen wie der wt AA8. Vergleicht man die hier gewonnen Daten mit den Werten der unter Abschnitt 4.3.1 durchgeführten γ H2AX-Focianalysen in fixierten Zellen, so legt dies nahe, dass der wt bei den γ H2AX-Focianalysen auf den gespreiteten Metaphase-Chromosomen zu viele Foci aufweist. Die Ursache hierfür ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch noch unklar. Unabhängig davon ist im Vergleich zu den HR-Mutanten im wt AA8 jedoch ein geringfügig höherer Anteil an paarigen γ H2AX-Foci nach Bestrahlung zu beobachten. Allerdings ist der Anteil der Doppelfoci in den wt-Zellen mit ca. 30 % weitaus geringer als man es unter der Annahme erwarten würde, dass zu diesem Zeitpunkt weitestgehend HR-assoziierte Strukturen vorhanden sind, welche ein Doppelfoci-Signal generieren sollten. Darüber hinaus verringert sich der Anteil der Doppelfoci in den HR-Mutanten nicht signifikant, was auf einen HR-unabhängigen Prozess bei der Entstehung der Doppelfoci hindeutet. Da jedoch die Unterschiede nur sehr gering sind und sich aufgrund der großen Schwankungen bei den Absolutzahlen im Rahmen der Fehlerbalken bewegen, kann anhand dieses Versuchs nicht eindeutig bestätigt werden, dass die Übertragung der H2AX-Phosphorylierung auf die Schwesterchromatide einen HR-abhängigen Prozess darstellt.

4.3.5.2 Kombinierte FISH- und γ H2AX-Focianalysen in Metaphase-Chromosomen von CHO-Zellen

Bei der Auswertung der unter Kapitel 4.3.5.1 aufgeführten γ H2AX-Focianalysen auf chromosomalen Spreitungen fiel auf, dass in den unbestrahlten Metaphasen aller CHO-

Zelllinien 50 - 80 % der paarigen γ H2AX-Foci bzw. 70 - 80 % in den bestrahlten Metaphasen am Chromosomenende auftreten (Abbildung 23). Für diese hohen Level an endständig auftretenden Doppelfoci gibt es zwei Interpretationsmöglichkeiten: Zum Einen könnte es sich um normale DSB-Enden bzw. gebrochene Chromosomen handeln, zum Anderen könnte es sich aber auch um H2AX-Phosphorylierungssignale handeln, die durch eine strahleninduzierte Schädigung der Telomer-Strukturen bzw. durch den strahleninduzierten Prozess des *uncappings* der Telomere (Auflösung der schützenden *T-Loop*-Struktur/*cap*) induziert werden (Shim et al. 2014; Di d'Adda Fagagna et al. 2004). Als Telomere bezeichnet man die Protein-DNA-Komplexe an den Chromosomenenden, die sich bei Säugern aus repetitiven TTAGGG-Sequenzen, einem einzelsträngigen 3'-Überhang, sowie aus einer Reihe von Proteinen zusammensetzen und als Template für die Verlängerung der Chromosomenenden durch die Telomerase agieren (Baumann 2001). Desweiteren verhindert die Ausbildung der sogenannten *T-Loop*-Struktur, bei der es sich um eine Art "Schutzkappe" (*cap*) handelt, die End-zu-End-Verknüpfung mit anderen Chromosomen sowie den nukleolytischen Abbau der Chromosomenenden und gewährt dadurch die Stabilität der Chromosomen (Lange 2004).

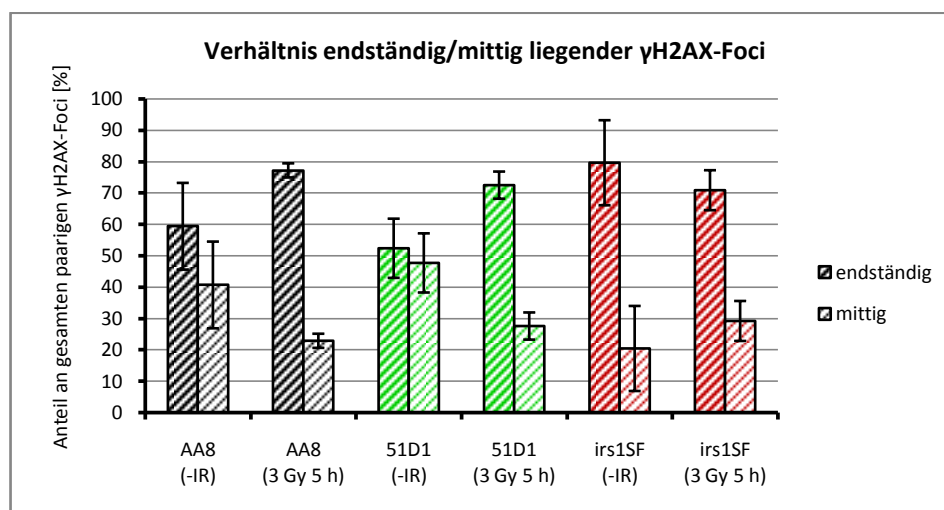


Abbildung 23: Verteilung der paarigen γ H2AX-Foci auf Metaphase-Chromosomen von CHO wt-Zellen und HR-Mutanten nach Bestrahlung in G2.

Exponentiell wachsende CHO wt- und HR-defiziente Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt, die Chromosomen nach 5 h fixiert und gegen γ H2AX und die DNA (DAPI) gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Analyse ausgeschlossen.

Die graphische Darstellung zeigt die räumliche Verteilung (mittig/endständig) der paarigen γ H2AX-Foci auf den Metaphase-Chromosomen nach Bestrahlung. Die Datenpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten von $n \geq 5$ Experimenten mit insgesamt $n \geq 154$ ausgewerteten Metaphasespreitungen pro Bedingung. Die Fehlerbalken spiegeln den Standardfehler der Mittelwerte von $n \geq 5$ Experimenten wider.

Durch die Etablierung einer weiteren neuen Färbemethode in unserem Labor sollte der Zusammenhang zwischen endständigen, paarigen γ H2AX-Foci und Telomeren näher untersucht werden. Hierfür wurde die Immunfluoreszenzfärbung (γ H2AX) mit der der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) kombiniert, um mit Hilfe von Telomer-(DNA)-

Sonden in gespreiteten Metaphase-Chromosomen zusätzlich zu γ H2AX die Telomere markieren und mögliche Kollokationen zwischen γ H2AX-Foci und Telomere analysieren zu können. Anhand dieser Untersuchungen sollten sich Rückschlüsse auf einen möglichen Bezug zwischen γ H2AX-Foci und Telomere ziehen lassen können.

Die Experimentdurchführung erfolgte analog zu der Prozedur des vorherigen Versuchs (Abschnitt 4.3.5.1). Nach der Fixierung der Chromosomen und der Färbung gegen γ H2AX wurden die Telomere mittels spezifischer FISH-Sonden markiert und zum Schluß die DNA mittels DAPI gefärbt. Anschließend wurden Aufnahmen von Metaphase-Chromosomen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop angefertigt und die Bilder am Computer manuell ausgewertet.

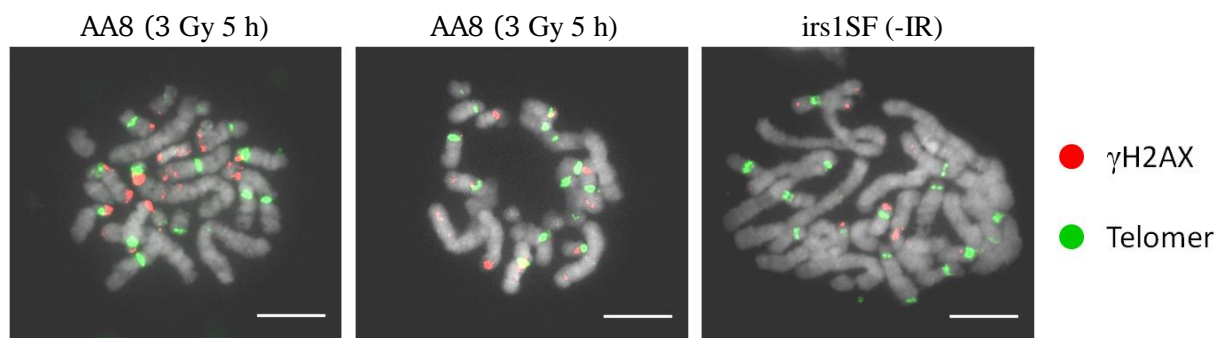


Abbildung 24: Metaphase-Chromosomen von CHO wt-Zellen mit γ H2AX-Foci und Telomer-Sonden. Exponentiell wachsende CHO wt-Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt, die Chromosomen nach 5 h auf Objektträgern gespreitet, fixiert und gegen γ H2AX gefärbt. Die Telomere wurden mittels Telomer-spezifischer FISH-Sonden markiert und die DNA mit DAPI gegengefärbt. Die Abbildungen zeigen exemplarische, immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Metaphase-Spreitungen von AA8 wt-Zellen und einer irs1SF HR-Mutantenzelle mit γ H2AX-Foci (rot) und Telomer-Sonden (grün). Der Maßstab entspricht 10 μ m.

Unabhängig von der Bestrahlung war in allen Zelllinien die Anzahl an Kollokationen von Telomeren und γ H2AX-Foci generell sehr gering, wodurch auch ein strahleninduzierter Anstieg der Kollokationen von Telomeren und paarig-auftretenden γ H2AX-Doppelfoci nicht zu beobachten war (Abbildung 24). Somit konnte ebenfalls ein strahleninduzierter Anstieg des γ H2AX-Focilevels an Telomeren ausgeschlossen werden. Des Weiteren war zu beobachten, dass sich die Telomere nicht bei jedem Chromosom am Chromosomenende befanden, sondern stattdessen sehr häufig in weiter mittig gelegenen Regionen des Chromosoms auftraten. Bei einigen Chromosomen waren sie sogar in unmittelbarer Nähe zur Centromerregion lokalisiert. Dies ist konsistent mit den Beobachtungen früherer Untersuchungen, die eine interstitielle Lokalisation von Telomer-Sequenzen auf den Chromosomen von CHO-Zellen beschreiben (Balajee et al. 1994).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich bei den am Chromosomenende auftretenden, paarigen γ H2AX-Foci um DSBs bzw. gebrochene Chromosomen handelt.

4.3.5.3 γ H2AX-Focianalysen in mitotischen Chromosomen in HeLa

Aufgrund des generell geringen Anteils an paarigen γ H2AX-Foci im wt AA8 und den nicht signifikanten Unterschieden zu den HR-Mutanten 51D1 und irs1SF konnte im CHO-System nicht eindeutig geklärt werden, ob die Generierung der paarigen γ H2AX-Foci auf einen HR-abhängigen Prozess zurückzuführen ist. Daher sollten die Ergebnisse im Folgenden im humanen System verifiziert werden.

Hierfür wurde die γ H2AX-Focianalyse in G2-bestrahlten, mitotischen Chromosomen in HeLa-Zellen wiederholt und untersucht, ob im menschlichen System paarige γ H2AX-Foci im Zuge der DSB-Reparatur über den Weg der HR auftreten. Da jede Zelllinie unterschiedliche Zellzykluseigenschaften besitzt und als Reaktion auf ionisierende Strahlung ein individuelles Checkpointverhalten zeigt, wurden die Versuchsbedingungen an das Verhalten der HeLa-Zelllinie angepasst. Diese Anpassungen basierten auf Ergebnissen ähnlicher, aktueller Forschungen sowie auf Erfahrungswerten im Umgang mit der HeLa-Zelllinie innerhalb unseres Labors. Generell proliferieren HeLa-Zellen langsamer als CHO-Zellen, weshalb die Strahlendosis auf 2 Gy reduziert und der Fixierungszeitpunkt auf 7 h nach der Bestrahlung festgelegt wurde, um möglichst vergleichbare Versuchsbedingungen gewähren zu können.

In den nachfolgenden Experimenten wurden exponentiell wachsende HeLa-Zellen mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt. Da der Anteil an Metaphasezellen im Vergleich zu den CHO-Zelllinien deutlich geringer war, wurden durch die Zugabe von Colcemid 1 h vor dem Fixierungszeitpunkt Metaphasen in der Mitose arretiert und somit ausreichend Zellen für die Analyse erhalten. Nach einer Reparaturzeit von 7 h wurden die Metaphase-Chromosomen auf Objektträgern gespreitet, fixiert und mit Hilfe Fluorochrom-gekoppelter Antikörper gegen γ H2AX und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Auswertung ausgeschlossen. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops wurden Bilder der gespreiteten Metaphase-Chromosomen angefertigt (Abbildung 25 A) und anschließend die Anzahl, Lage und Erscheinungsform (einzeln/paarig) der γ H2AX-Foci manuell am Computer ausgewertet. Aufgrund des variierenden Chromosomensatzes bei HeLa-Zellen wurden die Foci-Werte für eine bessere Vergleichbarkeit untereinander auf 70 Chromosomen normiert, was etwa dem durchschnittlichen Chromosomensatz einer HeLa-Zelle entspricht.

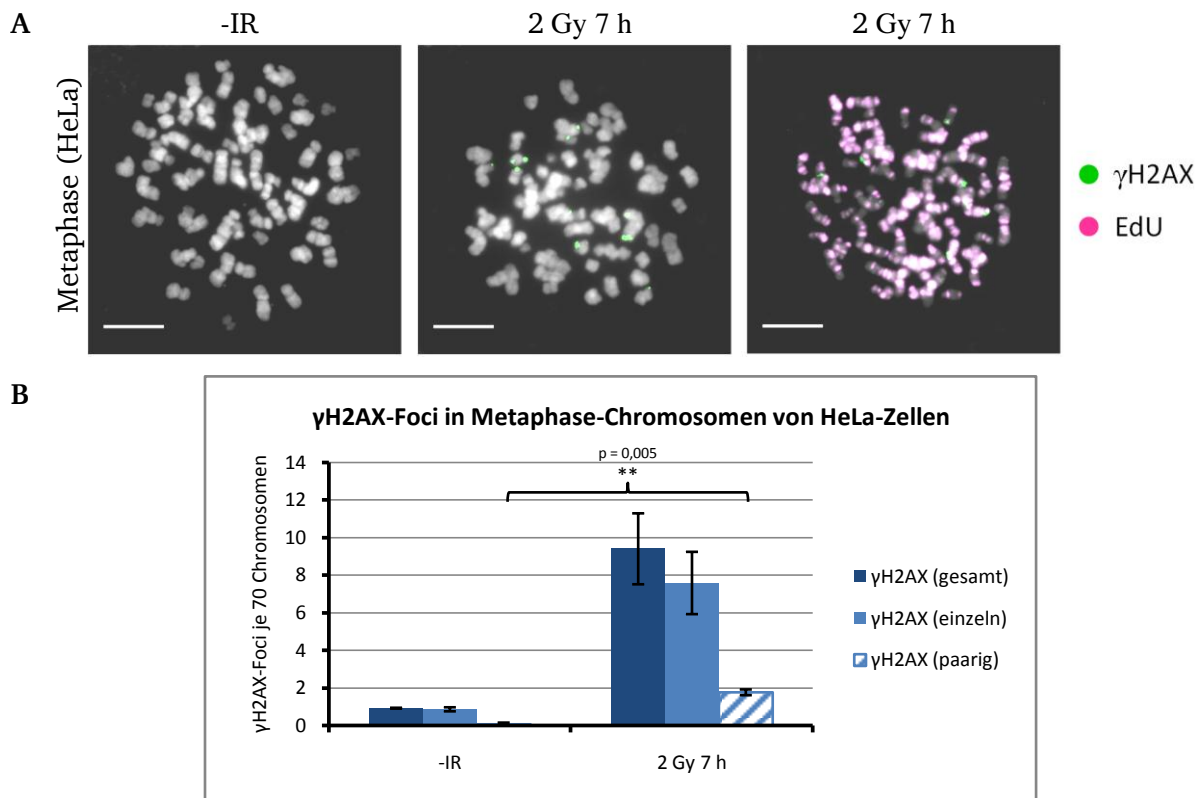


Abbildung 25: γ H2AX-Focianalysen in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen in HeLa-Zellen.

Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt. Nach 6 h wurde Colcemid hinzugegeben. Nach einer Reparaturzeit von 7 h wurden die Chromosomen auf Objektträgern gespreitet, fixiert und mittels Antikörper gegen γ H2AX und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mit EdU markiert, gefärbt und bei der Analyse ausgeschlossen. Am Immunfluoreszenzmikroskop wurden Bilder von Metaphase-Chromosomen aufgenommen und am Computer die γ H2AX-Foci manuell ausgewertet.

(A) Exemplarische, immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von unbestrahlten/EdU-negativen, G2-bestrahlten/EdU-negativen und G2-bestrahlten/EdU-positiven Metaphase-Chromosomen mit γ H2AX-Foci (grün) und EdU (magenta).

(B) Graphische Darstellung der γ H2AX-Focilevel in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte von 2 Experimenten mit insgesamt $n \geq 65$ ausgewerteten Metaphasen-Spreitungen/Bedingung. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte der 2 Experimente dar.

In den unbestrahlten Kontrollen liegt die γ H2AX-Gesamtfocianzahl auf einem sehr niedrigen Niveau von etwa 1 γ H2AX-Focus/Zelle und die γ H2AX-Foci treten fast ausschließlich einzeln auf (Abbildung 25 B). 7 h nach der Bestrahlung zeigen die Metaphase-Chromosomen etwa 9 γ H2AX-Foci/Zelle, wobei davon die paarig-auf tretenden γ H2AX-Foci etwa 2 Foci ausmachen.

Vergleicht man das Ergebnis mit den Werten der γ H2AX-Focianalysen in Metaphase-Chromosomen in CHO-Zelllinien (Abbildung 22 B + C), so zeigen die HeLa-Zellen einen unerwarteten, noch geringeren Anteil an paarigen γ H2AX-Foci als der CHO wt AA8. Als mögliche Ursache dafür könnte zum Einen ein zu früher oder zu später Fixierungszeitpunkt gewählt worden sein, zu dem es im Zuge der DSB-Reparatur über den Mechanismus der HR noch nicht zur Ausbildung von intermediären HR-Strukturen und zur Übertragung des H2AX-

Phosphorylierungssignals gekommen ist bzw. zu dem die Reparatur über die HR bereits abgeschlossen ist und die phosphorylierten H2AX-Histone auf dem Schwesterchromatid wieder dephosphoryliert wurden. Zum Anderen könnte die Entstehung der γ H2AX-Doppelfoci über einen HR-unabhängigen Prozess erfolgen und somit dem Modell der Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals widersprechen. Dies sollte im Rahmen der folgenden Experimente genauer untersucht werden.

4.3.5.4 γ H2AX-Focianalysen in Metaphase-Chromosomen nach HR-Inhibierung in HeLa

Aus der Beobachtung, dass auch nach Bestrahlung nur eine sehr geringer Anteil an γ H2AX-Foci paarig auftritt, entwickelte sich die Frage, ob die γ H2AX-Doppelfoci überhaupt auf HR-abhängige Prozesse zurückzuführen sind. Daher sollte in den nachfolgenden Experimenten mit Hilfe eines Inhibitors sowie verschiedener siRNAs der Mechanismus der HR zu verschiedenen Schritten inhibiert werden und die Auswirkungen auf das Level der γ H2AX-Doppelfoci untersucht werden. Desweiteren sollte analysiert werden, wie sich das Verhältnis einzeln-/paarig-auftretender γ H2AX-Foci im Vergleich zu dem bei HeLa wt-Zellen unterscheidet und daraus Rückschlüsse auf deren Entstehungsmechanismus gezogen werden. In dem folgenden Experiment sollte zunächst durch die Verwendung des Rad51-Rekombinase-Inhibitors B02 die HR zum Zeitpunkt der Homologiesuche bzw. der Stranginvasion in HeLa-Zellen unterbunden werden. Durch die Interaktion des Inhibitors mit der Rad51-Rekombinase wird deren Interaktion mit der DNA chemisch geblockt und somit der Strangaustausch zwischen den beiden Schwesterchromatiden während der HR unterbunden (Huang et al. 2011). Dementsprechend wurde für die mit B02 behandelten HeLa Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ein Reparaturdefekt sowie eine geringere Anzahl an paarigen γ H2AX-Foci erwartet.

Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden vor der Bestrahlung für 30 min mit dem Rad51-Inhibitor B02 inkubiert. Anschließend wurden sie mit 2 Gy bestrahlt. Durch die Zugabe von Colcemid wurden mitotische Zellen in der Metaphase über einen Zeitraum von 1 h vor den jeweiligen Fixierungszeitpunkten angereichert. Nach Reparaturzeiten von 4, 5 und 7 h wurden die Metaphase-Chromosomen auf Objektträgern gespreitet, fixiert und mit Hilfe von Antikörpern gegen γ H2AX und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Auswertung ausgeschlossen. Von den in G2-bestrahlten Metaphase-Spreitungen wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abbildung 26 A) und am Computer die Anzahl und die Erscheinungsform (einzeln-/paarig-auftretend) der γ H2AX-Foci

manuell bestimmt. Aufgrund des variierenden Chromosomensatzes bei HeLa-Zellen wurde die Anzahl der γ H2AX-Foci auf 70 Chromosomen normiert.

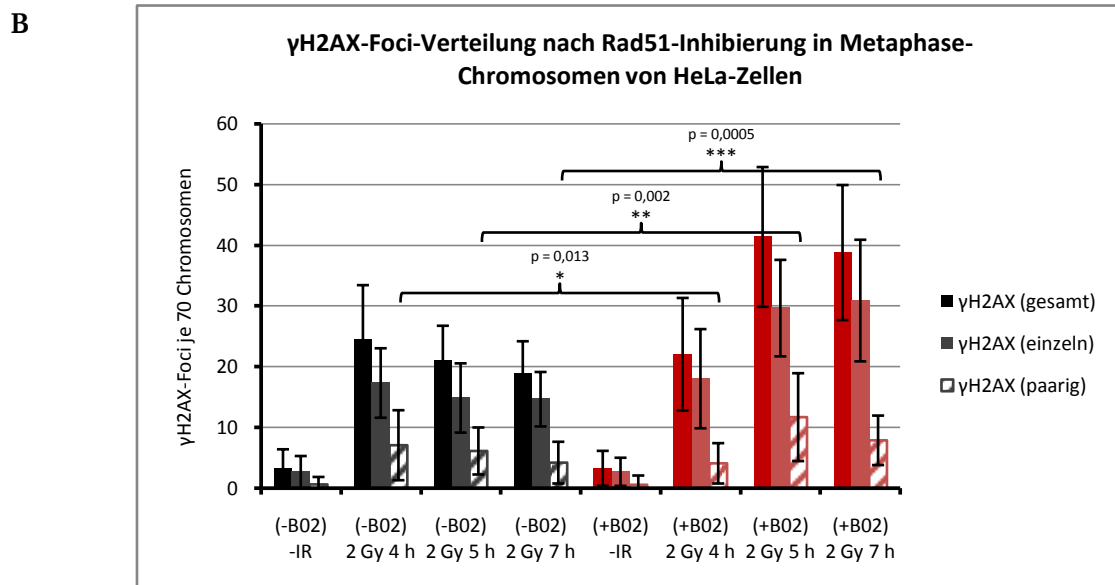
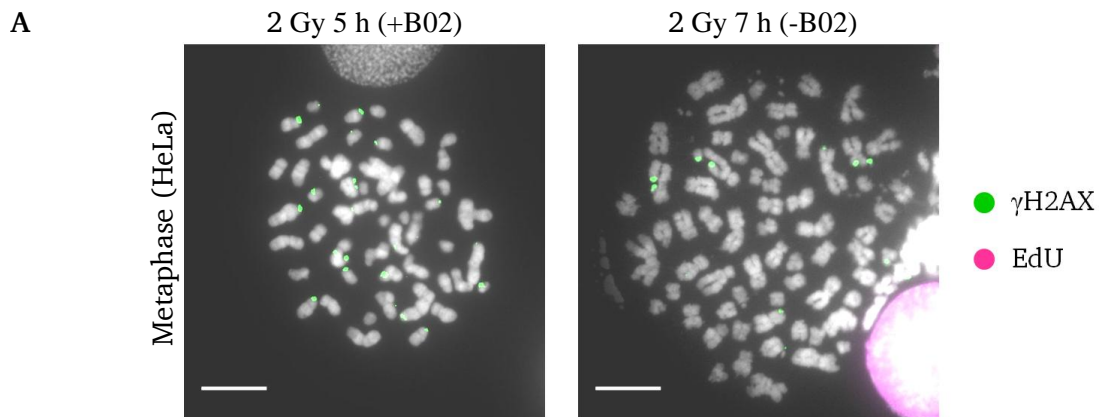


Abbildung 26: γ H2AX-Focianalysen in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen in wt- und HR-defizienten HeLa-Zellen.

Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden 30 min vor der Bestrahlung mit dem Rad51-Rekombinase-Inhibitor B02 inkubiert und anschließend mit 2 Gy bestrahlt. Durch eine 1-stündige Inkubationszeit mit Colcemid vor den Fixierungszeitpunkten wurden in den Zellkulturen Metaphasen angereichert. Nach einer Reparaturzeit von 4, 5 und 7 h wurden die Chromosomen auf Objektträgern gespreitet, fixiert und mit Antikörpern gegen γ H2AX und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Auswertung ausgeschlossen. Am Immunfluoreszenzmikroskop wurden Aufnahmen von G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen angefertigt und anschließend die γ H2AX-Foci manuell am Computer ausgewertet.

(A) Exemplarische, immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Metaphase-Chromosomen mit γ H2AX-Foci (grün) und EdU (magenta).

(B) Graphische Darstellung der γ H2AX-Focilevel in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen von wt- und B02 behandelten HeLa-Zellen. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus 1 Experiment mit $n \geq 40$ ausgewerteten Metaphase-Chromosomen/Bedingung. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der einzelnen Werte dar.

Die unbestrahlten Kontrollen der unbehandelten und der B02 behandelten HeLa-Zellen zeigen in der Metaphase ein fast identisch niedriges γ H2AX-Gesamtfocilevel von etwa 3 Foci/Zelle (Abbildung 26 B). Der Anteil an paarigen γ H2AX-Foci ist dabei vernachlässigbar niedrig.

Unbehandelte HeLa-Zellen weisen 4 h nach Bestrahlung etwa 24 γ H2AX-Foci/Zelle auf, von denen etwa 7 Foci paarig auftreten. Bis zum Versuchsende (7 h nach der Bestrahlung) nehmen sowohl die Anzahl der γ H2AX-Gesamtfozizahl als auch die der Doppelfoci leicht ab. Die B02 behandelten Zellen zeigen 4 h nach der Bestrahlung mit etwa 22 Foci ähnliche γ H2AX-Gesamtfozizahlen wie die unbehandelten Zellen, wobei die paarigen γ H2AX-Foci dabei mit etwa 4 Foci/Zelle einen geringeren Anteil ausmachen. Im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen zeigen die B02 behandelten Zellen zunächst bis 5 h nach der Bestrahlung eine Zunahme aller γ H2AX-Focizahlen. Ab 5 h nach der Bestrahlung ist bei den HR-defizienten HeLa-Zellen mit etwa doppelt so vielen γ H2AX-Gesamtfoci wie bei den unbehandelten Zellen ein deutlicher Reparaturdefekt auszumachen. Darüber hinaus ist bei ihren Metaphase-Chromosomen erst 7 h nach der Bestrahlung eine leichte Abnahme der γ H2AX-Gesamtfoci- und der Doppelfocianzahl zu beobachten. Entgegen den Erwartungen liegen zu späten Zeiten nach der Bestrahlung bei den HR-defizienten Zellen die Anzahl der paarigen γ H2AX-Foci mit etwa 11 (5 h) bzw. 7 Foci/Zelle (7 h) nahezu doppelt so hoch wie bei den unbehandelten Zellen.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so wird deutlich, dass die Anzahl der γ H2AX-Doppelfoci in den HeLa-Zellen generell noch geringer ist als in den CHO-Zellen, was entweder auf die Wahl eines ungünstigen Fixierungszeitpunktes zurückzuführen ist oder darauf, dass HR-Intermediate nicht oder nicht vollständig durch Doppelfoci markiert sind. Besonders in den unbehandelten HeLa-Zellen ist ein unerwartet niedriges Level an paarigen Foci zu beobachten. Sofern die Entstehung der Doppelfoci auf einen HR-abhängigen Prozess zurückzuführen ist, könnte entsprechend der Hypothese (Kapitel 4.3.4) das auf das intakte Chromatid übertragene Phosphorylierungssignal nur über einen kurzen Zeitraum detektierbar sein. Im Zuge der fortschreitenden Reparatur bzw. durch die Auflösung der intermediären Reparaturstrukturen entfernen sich die beiden Schwesterchromatiden wieder voneinander und die γ H2AX-Histone werden zunehmend dephosphoryliert. Da das γ H2AX-Signal auf dem intakten Chromatid nur übertragen wurde, könnte es eine geringere Intensität als das γ H2AX-Signal des geschädigten Stranges aufweisen und dadurch die γ H2AX-Histone des intakten Chromatids früher vollständig dephosphoryliert sein als die des ursprünglich geschädigten Stranges. Demzufolge wären möglicherweise zu den in diesem Versuch gewählten, späten Fixierungszeitpunkten nach der Bestrahlung (4, 5 und 7 h) nur noch die γ H2AX-Foci des ursprünglich geschädigten Stranges als einzeln auftretende Foci zu erkennen.

Darüber hinaus zeigen die beiden unterschiedlich behandelten HeLa-Populationen unabhängig von der Rad51-Inhibition 4 h nach der Bestrahlung in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen vergleichbare γ H2AX-Focizahlen. Dies ist konsistent mit den eigenen

Beobachtungen in Abbildung 17 B und bereits veröffentlichten Studien von Beucher et al., die einen Reparaturdefekt von HR-defizienten Zellen erst zu späten Zeiten der DSB-Reparatur zeigen (Beucher et al. 2009). Interessanterweise tritt der Reparaturdefekt der B02 behandelten HeLa-Zellen 5 - 7 h nach der Bestrahlung nicht dadurch auf, dass die Focizahlen in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen von HR-defizienten Zellen gleich bleiben, während die unbehandelten HeLa-Zellen weiter gut reparieren, sondern vielmehr dadurch, dass die Focilevel der HR-defizienten Zellen zu späten Zeiten nach der Bestrahlung weiter ansteigen. Die Ursache dafür ist im Moment unklar. Möglicherweise könnte der Effekt auf Instabilitäten zurückzuführen sein, die durch die Inkubation der Zelle mit dem Inhibitor B02 hervorgerufen werden. Interessanterweise zeigen die B02 behandelten Zellen, bei denen die HR inhibiert ist und somit unserer Hypothese nach eine potentielle Phosphorylierungsübertragung des γ H2AX-Signals auf das Schwesterchromatid unterbunden sein sollte, im Vergleich zu den unbehandelten HeLa-Zellen nahezu doppelt so viele paarig auftretende γ H2AX-Foci. Dies zeigt, dass die Inhibierung der Rad51-Rekombinase und damit die Inhibierung des Mechanismus der HR zu einem frühen Schritt in humanen Zellen nicht zu einer Abnahme der paarigen γ H2AX-Foci führt und könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Entstehung der Doppelfoci kein HR-abhängiger Prozess ist.

4.3.5.5 γ H2AX-Focianalysen in Metaphase-Chromosomen nach Depletion unterschiedlicher HR-beteiligter Faktoren in HeLa-Zellen

In diesem Experiment sollten die im vorherigen Versuch (Abbildung 26) erhaltenen Hinweise auf eine HR-unabhängige Generierung der paarigen γ H2AX-Foci überprüft werden. Dafür sollten Versuchsbedingungen gewählt werden, zu denen beim wt im Falle einer HR-abhängigen Doppelfocientstehung ein höheres Doppelfocilevel erwartet werden würde. Dies sollte durch die Inhibierung von späten Prozessen der HR erreicht werden, wodurch die Auflösung der intermediären Reparaturintermediate unterbunden ist. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch die voranschreitende Reparatur und damit durch die einhergehende Dephosphorylierung in wt-Zellen die Anzahl der Doppelfoci zu einem bestimmten Zeitpunkt unterschätzt wird, sollte darüber hinaus untersucht werden, ob durch die Inhibierung unterschiedlicher, später Teilschritte der HR ein höheres Level an paarigen γ H2AX-Foci erhalten bleibt.

Da für die meisten an der HR-beteiligten Proteine keine Inhibitoren vorhanden sind, wurden die Proteine mittels siRNA herunterreguliert. Zunächst sollte die HR unmittelbar nach dem Schritt des Strangaustausches durch die Herunterregulation von Rad54 unterbunden werden.

Rad54 entfernt Rad51 vom HR-Intermediat bevor die homologe Sequenz durch die DNA-Polymerase repliziert wird (Solinger et al. 2002). Durch die Herunterregulation von Rad54 bliebe das Rad51-Nukleoproteinfilament auf dem invadierten Einzelstrang erhalten, wodurch die anschließende Elongation der resektierten Enden nicht initiiert werden könnte, die weitere Prozessierung der HR-Intermediate blockiert wäre und der Phosphorylierungsstatus über einen längeren Zeitraum erhalten bliebe.

Neben Rad54 sollte durch die Herunterregulation von Mus81 die HR zu einem noch späteren Schritt inhibiert werden. Bei Mus81 handelt es sich um die katalytische Einheit des Mus81-Eme1 Komplexes, welcher neben HR-Intermediaten wie D-Loops und Holliday Junctions auch Strukturen wie 3'-*Flaps* (3'-Überhänge) oder blockierte Replikationsgabeln auflöst (Boddy et al. 2001; Gaillard et al. 2003; Osman et al. 2003; Whitby 2002; Fricke et al. 2005). Sollte die Dephosphorylierung erst nach der Auflösung der HR-Intermediate stattfinden, so würden durch die Herunterregulierung von Mus81 HR-Intermediate wie D-Loops oder Holliday Junctions nicht aufgelöst werden und die Dephosphorylierung der übertragenen γ H2AX-Signale auf das Schwesterchromatid möglicherweise nicht einsetzen. Folglich würde in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen ein im Vergleich zum wt erhöhtes Level an γ H2AX-Doppelfoci erwartet werden.

Für das Experiment wurden über 48 h in HeLa-Zellen Rad54 und Mus81 mittels siRNA herunterreguliert. Zusätzlich wurde eine Kontrollzelllinie mitgeführt, bei der die verwendete siRNA (siCtrl) keinen komplementären Bindungspartner hat und dementsprechend unwirksam bleibt. Die exponentiell wachsenden Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt und vor der Fixierung für 1 h mit Colcemid behandelt. Nach einer Reparaturzeit von 7 h wurden die Chromosomen auf Objektträgern gespreitet, fixiert und mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen γ H2AX und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Auswertung ausgeschlossen. Von den in der G2-Phase bestrahlten Metaphase-Chromosomen wurden Aufnahmen am Immunfluoreszenzmikroskop angefertigt (Abbildung 27 C) und diese am Computer manuell analysiert. Dabei wurde die Anzahl und die Erscheinungsform (einzeln-/paarig-auf tretend) der γ H2AX-Foci bestimmt und die erhaltenen Werte aufgrund des variierenden Chromosomensatzes bei HeLa-Zellen auf 70 Chromosomen normiert. In parallelen Ansätzen wurde die Effektivität der Herunterregulation überprüft. Hierfür wurden HeLa-Zellen auf Deckgläsern ausgesät, zum Zeitpunkt des Hauptexperiments ebenfalls mit 2 Gy bestrahlt und nach 2 h fixiert. Im Fall der Rad54-siRNA wurden die Zellen mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper gegen Rad51 und Rad54

sowie DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Bei der Mus81-siRNA-Überprüfung wurden die Zellen gegen Mus81 und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Von den Zellen wurden anschließend immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

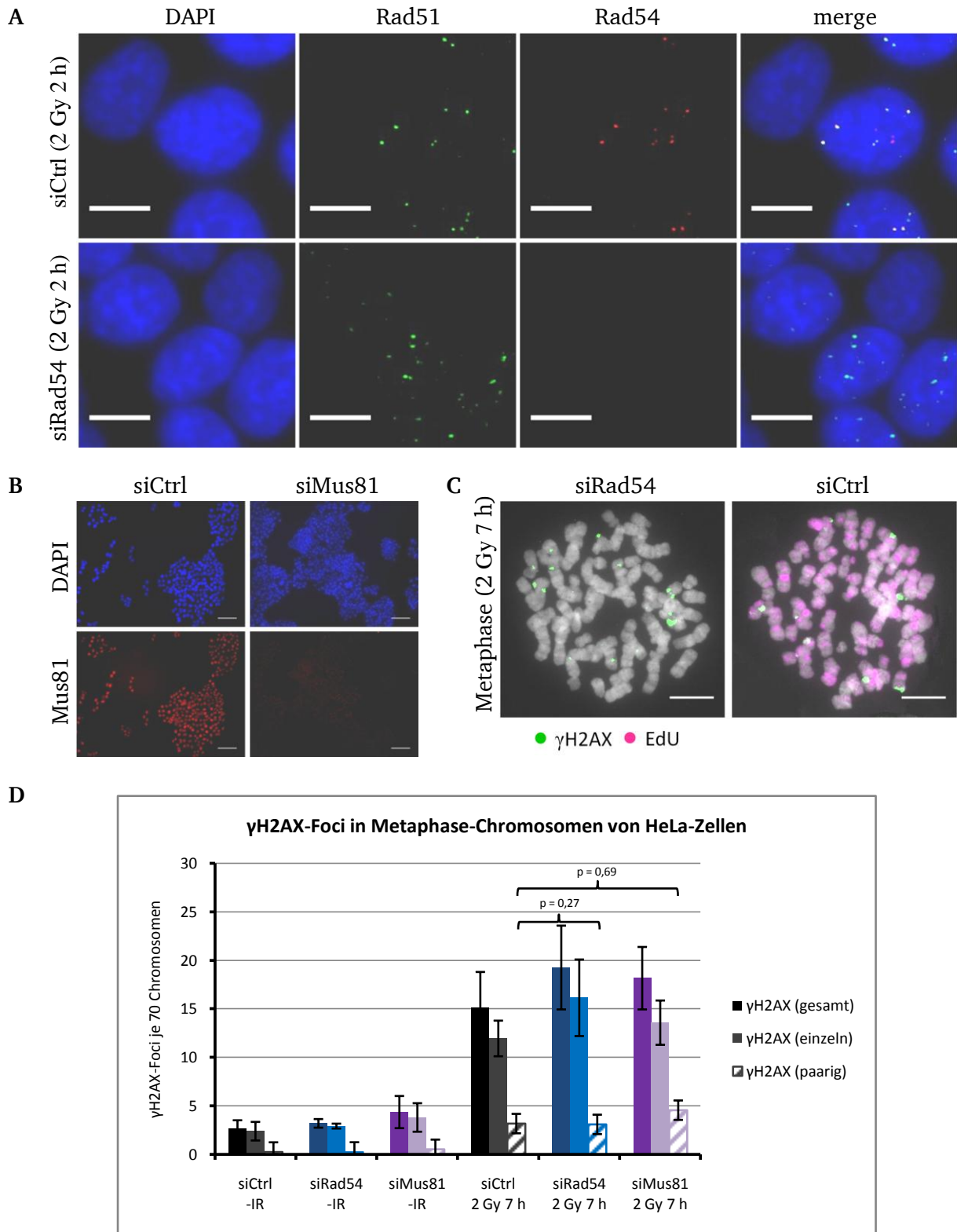


Abbildung 27: γH2AX-Focianalysen in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen in HeLa-Zellen nach siRNA-induzierter Inhibierung unterschiedlicher Reaktionsschritte der HR.

-
- (A) Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Kontroll-siRNA (siCtrl) und Rad54-siRNA (siRad54) behandelten HeLa-Zellen zur Überprüfung der Rad54-siRNA-Effektivität. Der Maßstab entspricht 10 μm . HeLa-Zellen wurden für 48 h mit Rad54-siRNA behandelt, anschließend mit 2 Gy bestrahlt und nach 2 h fixiert. Mittels Antikörper gegen Rad51 (grün), Rad54 (rot) und DAPI (blau) als DNA-Farbstoff wurden die Zellen gefärbt und immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt.
- (B) Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Kontroll-siRNA (siCtrl) und Mus81-siRNA (siMus81) behandelten HeLa-Zellen zur Überprüfung der siRNA-Effektivität. Der Maßstab entspricht 100 μm . HeLa-Zellen wurden über 48 h mit Mus81-siRNA behandelt, anschließend mit 2 Gy bestrahlt und nach 2 h fixiert. Die Zellen wurden mittels Antikörper gegen Mus81 (rot) und DAPI (blau) als DNA-Farbstoff gefärbt und anschließend Aufnahmen von den Zellen am Immunfluoreszenzmikroskop angefertigt.
- (C) Exemplarische, immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Metaphase-Chromosomen in HeLa-Zellen mit γH2AX -Foci (grün) und EdU (magenta) nach siRNA-Behandlung. Der Maßstab entspricht 10 μm .
- (D) Graphische Darstellung der γH2AX -Focilevel in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen in HeLa-Zellen nach siRNA-Behandlung. Nach der 48-stündigen Herunterregulierung von Rad54 bzw. Mus81 mittels siRNA wurden die exponentiell wachsenden HeLa-Zellen mit 2 Gy bestrahlt. Vor der Fixierung wurden die Chromosomen für 1 h mit Colcemid behandelt. 7 h nach der Bestrahlung wurden die Chromosomen auf Objektträgern gespreitet, fixiert und mittels Antikörper gegen γH2AX und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Analyse ausgeschlossen. Von G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt und am Computer die Anzahl der γH2AX -Foci, sowie deren Erscheinungsform (einzeln-/paarig-auf tretend) manuell ausgewertet und auf 70 Chromosomen normiert. Die Datenpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten von insgesamt $n \geq 54$ ausgewerteten Metaphase-Spreitungen/Bedingung aus zwei Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der einzelnen Werte.

Nach der Behandlung mit Rad54-siRNA (siRad54) weisen die HeLa-Zellen keine Rad54-Foci auf Einzelzellebene auf, während Rad54-Foci bei den siCtrl-Zellen zu erkennen sind und größtenteils mit Rad51-Foci kolokalisieren, was ihre Spezifität für HR-Prozesse widerspiegelt (Abbildung 27 A). Dies beweist eine effektive Rad54-Herunterregulation. Nach der Mus81-siRNA-Behandlung (siMus81) zeigen die Zellen im Vergleich zu den Kontroll-siRNA (siCtrl) behandelten Zellen im Mus81-Kanal eine deutlich geringere Intensität, was auf eine effektive Herunterregulierung von Mus81 zurückzuführen ist (Abbildung 27 B).

Im unbestrahlten Zustand zeigen die Metaphase-Chromosomen der siCtrl-Zellen mit etwa 2,5 γH2AX -Foci/Zelle eine niedrige γH2AX -Gesamtfocianzahl (Abbildung 27 D). Die mit Rad54-siRNA (siRad54) bzw. Mus81-siRNA (siMus81) behandelten Zellen zeigen mit etwa 3 bzw. 4 γH2AX -Foci/Zelle ein geringfügig höheres Hintergrundniveau. Dabei sind bei allen Zelllinien nahezu keine paarigen γH2AX -Foci zu erkennen. Nach einer Dosis von 2 Gy und einer Reparaturzeit von 7 h steigt die Anzahl der γH2AX -Gesamtfoci in den Metaphase-Chromosomen der siCtrl-Zellen auf 15 Foci/Zelle. Der Anteil an γH2AX -Doppelfoci liegt bei etwa 3 Foci/Zelle. Die HR-defiziente Zelllinie (siRad54) zeigt 7 h nach der Bestrahlung im Vergleich den siCtrl-Zellen mit etwa 19 γH2AX -Gesamtfoci/Zelle einen leichten Reparaturdefekt. Der Anteil an paarigen γH2AX -Foci liegt mit 3 Foci/Zelle auf dem selben Niveau wie bei den siCtrl-Zellen. Nach der Herunterregulation von Mus81 zeigen die in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen mit etwa 18 γH2AX -Foci/Zelle im Vergleich zu den siCtrl-Zellen

ebenfalls eine leicht erhöhte γ H2AX-Gesamtfocianzahl. Die Anzahl paariger γ H2AX-Foci beträgt dabei etwa 4,5 Foci/Zelle und liegt geringfügig höher als bei den anderen Zelllinien. Zusammenfassend zeigen die G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen aller Zelllinien einen strahleninduzierten Anstieg der γ H2AX-Gesamtfoci- und der γ H2AX-Doppelfocianzahl. Desweiteren ist nach Mus81- und Rad54-Herunterregulierung im Vergleich zu den siCtrl-Zellen sowohl im unbestrahlten Zustand, als auch nach Bestrahlung eine leichte Erhöhung der γ H2AX-Gesamtfocizahlen auszumachen. Darüber hinaus weisen die siMus81-Zellen eine geringfügig erhöhte Anzahl an paarigen γ H2AX-Foci nach Bestrahlung auf. Jedoch ist dieser Anstieg nicht signifikant. Damit bestätigen die Ergebnisse die Beobachtungen des vorherigen Versuches und liefern einen erneuten Hinweis auf einen HR-unabhängigen Mechanismus der Doppelfocientstehung.

4.3.6 γ H2AX-Focianalysen zu frühen Zeiten nach Bestrahlung in Chromosomen der G2-Phase von HeLa-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass entgegen den Erwartungen weder die Inhibierung der HR vor und nach der Homologiesuche und der Stranginvasion, noch die Inhibierung der Auflösung der HR-Intermediate zu einem signifikant erhöhten γ H2AX-Doppelfocilevel führt. Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Entstehung der Doppelfoci ein HR-unabhängiger Mechanismus zugrunde liegt. Dies sollte in einem abschließenden Experiment bestätigt werden.

Sofern die Generierung der γ H2AX-Doppelfoci mit der HR assoziiert wären, sollten sie zu frühen Zeiten nach Bestrahlung noch nicht ausgebildet sein und erst zu späten Zeiten nach Bestrahlung erscheinen, da die Ausbildung der HR-Intermediate ein langsamer Prozess ist. Während in den bisherigen Experimenten das Doppelfociniveau nur zu späten Zeiten nach Bestrahlung (ab einer Reparaturzeit von 4 h) in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen ermittelt wurde, sollte daher in den folgenden Experimenten das Level an paarigen γ H2AX-Foci zu einer frühen Zeit nach Bestrahlung (1 h nach einer Dosis von 2 Gy) untersucht werden. Zu diesem Zeitpunkt sollte noch keine Homologiesuche und Stranginvasion im Zuge der HR stattgefunden haben, weshalb keine paarigen γ H2AX-Foci bei einer HR-abhängigen Generierung erwartet werden würden. Sofern jedoch zu diesem Zeitpunkt bereits paarige γ H2AX-Foci detektierbar wären, würde dies für eine HR-unabhängige Doppelfocientstehung sprechen. Da die Aktivierung des G2/M-Checkpoints nach Bestrahlung den Eintritt von G2-Zellen in die Mitose verhindert (Kapitel 4.1), ist eine γ H2AX-Focianalyse von G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen zu frühen Zeiten nach Bestrahlung nicht möglich. Daher sollte in

HeLa-Zellen das γ H2AX-Focilevel 1 h nach Bestrahlung in Chromosomen von G2-Phasezellen ermittelt werden. Zusätzlich sollte das γ H2AX-Focilevel zu späten Zeiten nach Bestrahlung in G2-Phase-Chromosomen und G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen ermittelt und miteinander verglichen werden. Im Gegensatz zu Metaphasezellen liegen die Chromosomen der G2-Phasezellen jedoch nicht kondensiert vor. Durch die Behandlung mit dem Phosphatase-Inhibitor Calyculin A werden die Aktivitäten der Serin/Threonin Proteinphosphatasen PP1 und PP2A inhibiert, wodurch eine vorzeitige Chromosomenkondensation induziert wird (Resjö et al. 1999; Ishihara et al. 1989; Gotoh et al. 1995). Auf diese Weise lassen sich γ H2AX-Focianalysen auch in G2-Chromosomen durchführen.

Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt. Für die Analyse der G2-Phase-Chromosomen wurden die Zellen 30 min vor der Fixierung mit Calyculin A behandelt und dadurch eine vorzeitige Chromosomenkondensation eingeleitet. Die Chromosomen wurden nach 1, 4 und 7 h nach Bestrahlung auf Objektträger gespreitet und fixiert. Für die Analyse der Metaphase-Chromosomen wurden die Zellen 1 h vor der Fixierung mit Colcemid behandelt, um mitotische Zellen in der Metaphase zu arretieren. Die Chromosomen wurden 4 bzw. 7 h nach Bestrahlung auf Objektträger gespreitet und fixiert. Alle Chromosomen wurden anschließend mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper gegen γ H2AX und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Auswertung ausgeschlossen. Von den G2-Phase- bzw. Metaphase-Chromosomen wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abbildung 28 A) und am Computer manuell ausgewertet. Wie in den vorherigen Experimenten wurden die Focizahlen auf 70 Chromosomen normiert.

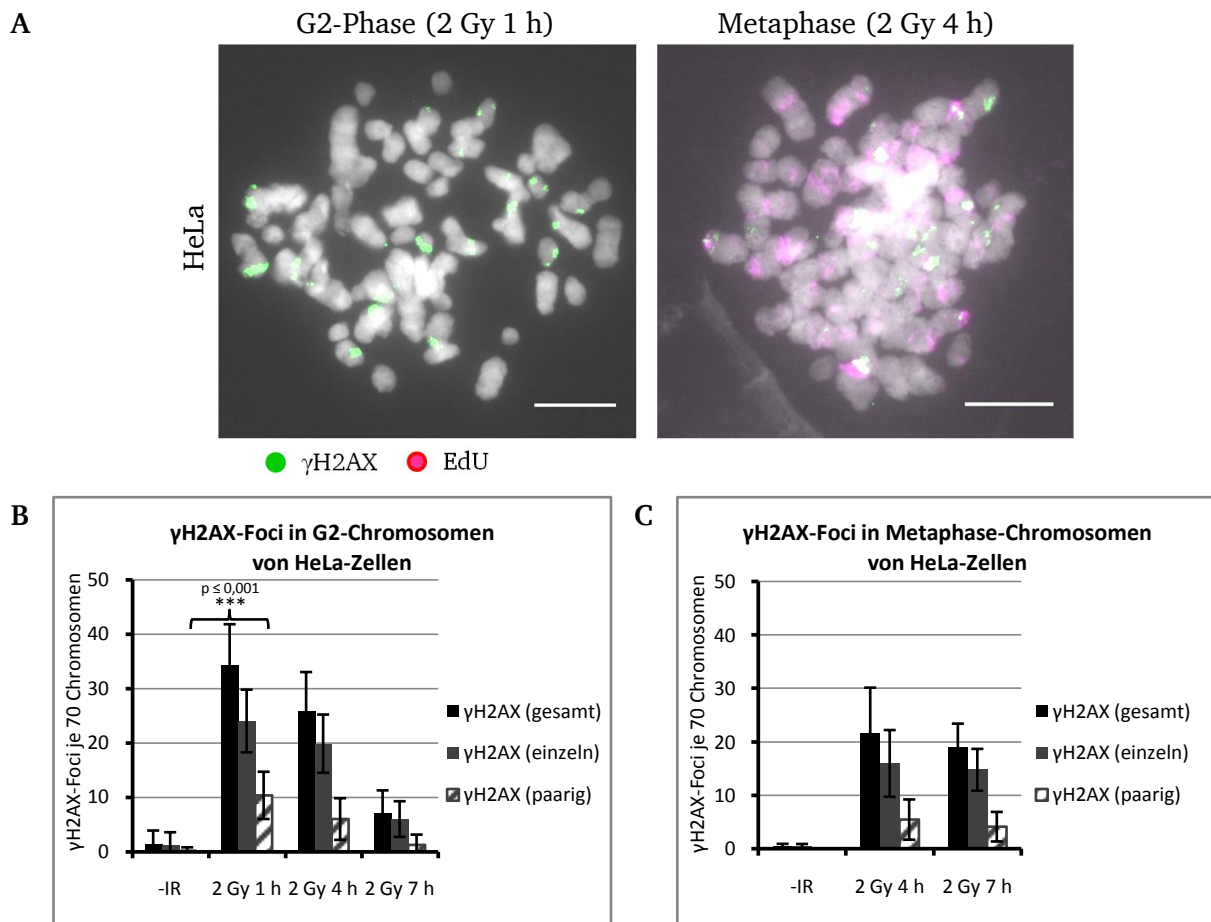


Abbildung 28: γ H2AX-Focianalysen in G2-bestrahlten G2-Phase- und Metaphase-Chromosomen von HeLa-Zellen. (A) Exemplarische, immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von G2-bestrahlten Chromosomen der G2- und Metaphase mit γ H2AX (grün) und EdU (magenta). Der Maßstab entspricht 10 μ m. (B) Graphische Darstellung der γ H2AX-Focilevel von Chromosomen der G2-Phase von HeLa-Zellen nach Bestrahlung. Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt und vor den Fixierungszeiten für 30 min mit Calyculin A behandelt. 1, 4 und 7 h nach der Bestrahlung wurden die Chromosomen auf Objektträger gespreitet, fixiert und mittels Antikörper gegen γ H2AX und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Auswertung ausgeschlossen. Von den gespreiteten G2-Phase-Chromosomen wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt und die γ H2AX-Focilevel manuell am Computer ermittelt. Die Datenpunkte zeigen den Mittelwert eines Experimentes mit n = 40 ausgewerteten Zellen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der einzelnen Datenpunkte dar. (C) Graphische Darstellung der γ H2AX-Focilevel von G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen von HeLa-Zellen. Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt und vor den Fixierungszeiten für 1 h mit Colcemid behandelt. 4 und 7 h nach der Bestrahlung wurden die Chromosomen auf Objektträgern gespreitet, fixiert und mittels Antikörper gegen γ H2AX und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Auswertung ausgeschlossen. Von den gespreiteten Metaphase-Chromosomen wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht und die γ H2AX-Focilevel manuell am Computer ermittelt. Die Datenpunkte zeigen den Mittelwert eines Experimentes mit n = 40 ausgewerteten Zellen/Bedingung. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der einzelnen Datenpunkte dar.

Bei den γ H2AX-Focianalysen zeigen die G2-Phase-Chromosomen unbestrahlter Zellen mit insgesamt etwa 1 γ H2AX-Focus/Zelle ein niedriges Hintergrundniveau (Abbildung 28 B). Dabei treten die Foci fast ausschließlich einzeln auf. 1 h nach Bestrahlung weisen die G2-

Chromosomen insgesamt etwa 35 γ H2AX-Foci/Zelle auf, von denen etwa 10 Foci in Form von paarigen γ H2AX-Foci auftreten. 4 h nach Bestrahlung liegt das γ H2AX-Gesamtfocilevel bei etwa 25 Foci/Zelle. Auch die paarigen Foci verzeichnen einen Rückgang auf etwa 5 Foci/Zelle. Nach einer weiteren Reparaturzeit von 3 h sinkt das γ H2AX-Gesamtfocilevel deutlich bis auf etwa 7 γ H2AX-Foci/Zelle. Der Anteil an paarigen γ H2AX-Foci macht dabei etwa 1 Focus aus. Unbestrahlte Metaphase-Chromosomen zeigen ein niedriges γ H2AX-Gesamtfocilevel, das ausschließlich aus einzeln auftretenden γ H2AX-Foci besteht (Abbildung 28 C). 4 h nach Bestrahlung zeigen G2-bestrahlte Metaphase-Chromosomen eine Gesamtfocizahl von etwa 21 Foci/Zelle. Die γ H2AX-Doppelfoci machen dabei einen Anteil von etwa 5 Foci aus. 7 h nach der Bestrahlung zeigen die Gesamtfocianzahl und das Doppelfocuslevel nur einen minimalen Rückgang und zeigen nahezu identische Werte wie beim 4 h-Punkt. Die γ H2AX-Focidaten der Metaphase-Chromosomen sind mit den Ergebnissen der vorherigen Experimente (Abbildung 26 B und Abbildung 27 D) vergleichbar.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so ist bei den G2-Phase- und Metaphase-Chromosomen ein deutlicher, strahleninduzierter Anstieg der γ H2AX-Gesamtfocianzahl sowie der Doppelfocianzahl zu erkennen. Während in der G2-Phase mit zunehmender Reparaturzeit ein kontinuierlicher Rückgang aller γ H2AX-Foci zu verzeichnen ist, bleiben sowohl die γ H2AX-Gesamtfocizahlen als auch die Anzahl der Doppelfoci bei den Metaphase-Chromosomen nahezu unverändert. Die wichtigste Erkenntnis dieses Experimentes ist jedoch, dass die paarigen γ H2AX-Foci bereits 1 h nach Bestrahlung vorhanden sind und sich ihr prozentualer Anteil zur Gesamtfocianzahl über die Zeit kaum ändert. Dies legt nahe, dass der größte Anteil der paarigen γ H2AX-Foci bereits zu frühen Zeiten nach der Schadensinduktion und damit vor der Stranginvasion und der Homologiesuche im Zuge der HR detektierbar ist.

Somit bestätigen die Beobachtungen die Hinweise der vorherigen Versuche und lassen daraus schlussfolgern, dass die Entstehung der paarigen γ H2AX-Foci auf einen HR-unabhängigen Mechanismus zurückzuführen ist.

Die Annahme, dass die Generierung der anfänglich beobachteten γ H2AX-Doppelfoci auf eine Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals zurückzuführen sei, welche im Zuge von Prozessen wie der räumlichen Annäherung der beiden Schwesterchromatiden oder der Stranginvasion während der HR stattfinden könnte, konnte nicht nachgewiesen werden. Allerdings wäre es nach wie vor möglich, dass eine Phosphorylierungsübertragung von der geschädigten auf die ungeschädigte Chromatide aufgrund der räumlichen Nähe der Chromatiden in der G2-Phase HR-unabhängig erfolgt. Dieser Umstand wurde allerdings im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

4.4 Untersuchungen zur Auflösung von strahleninduzierten HR-Intermediaten in der Mitose

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Auflösung der strahleninduzierten, intermediären Reparaturstrukturen der HR. Aus den Ergebnissen des ersten Teils, die zeigten, dass G2-Phasezellen nach Bestrahlung mit HR-Intermediaten in die Mitose eintreten, entwickelte sich die Fragestellung, wie die HR-Intermediate im weiteren Verlauf der Mitose prozessiert werden. Besonders im Hinblick auf die bevorstehende Schwesterchromatidentrennung während der Anaphase sollten die Zusammenhänge der Auflösung der HR-Intermediate genauer untersucht werden, da eine nicht rechtzeitige Auflösung von Chromatin-*Entanglements* die Trennung der Chromatiden und damit die Zellteilung behindern könnte. Neben einer ungleichen Verteilung der Chromatiden auf die beiden Tochterzellen (Aneuploidie) könnten die Überkreuzungsstrukturen auch durch die Zugkräfte der Spindelfaser mechanisch auseinandergerissen und dadurch neue, komplexe DSBs induziert werden. Beide Fälle stellen für die Zelle eine Gefährdung der genomischen Integrität dar und könnten, abhängig von der Schwere der DNA-Schädigung, letal sein.

In der Literatur ist im humanen System eine Auflösung von Chromatin-*Entanglements* und blockierten Replikationsgabeln nur als Folge von Replikationsstress durch die Beteiligung von Helikasen und Nukleasen beschrieben (Mimitou und Symington 2009; Wu und Hickson 2003; Ip et al. 2008). Während der Interphase katalysiert die Helikase BLM zusammen mit TopoIII α und dem Protein hRMI1 (BLAP75) die Auflösung von Holliday Junctions und von Holliday Junction-ähnlichen Strukturen von Replikations-Intermediaten (Matos et al. 2011). Neben BLM ist auch die humane Endonuklease Mus81-Eme1 an der Auflösung von Replikationsstress-bedingten Rekombinationsintermediaten bzw. blockierten Replikationsgabeln beteiligt. Mus81 ist dabei die katalytische Untereinheit der Mus81-Eme1 Endonuklease und schneidet Replikations-Intermediate, *nicked* 3'-Flap-Strukturen, D-Loops und Holliday Junctions, letztere jedoch mit geringer Effektivität (Bastin-Shanower et al. 2003; Schwartz et al. 2012; Osman et al. 2003, Pepe und West 2014a). Mus81 zeigt in der G1-, S- und G2-Phase nur eine geringe Aktivität, welche aber zum Mitoseeintritt schnell ansteigt und in der Prometaphase ihr Maximum erreicht.

Zusammengefasst beschreibt die bisherige Literatur eine Helikase- und Nuklease-abhängige Auflösung von Chromatin-*Entanglements* nur als Folge von Replikationsstress. Da es nach der Bestrahlung im Zuge der DSB-Reparatur über den Mechanismus der HR auch zur Ausbildung von Chromatin-*Entanglements* in Form von intermediären Reparaturstrukturen wie D-Loops und Holliday Junctions kommt, könnte die Auflösung dieser strahleninduzierten HR-

Intermediate ebenfalls über einen Nuklease- und Helikase-abhängigen Weg erfolgen. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob auch die in der G2-Phase induzierten und in die Mitose gelangten HR-Intermediate vor der Chromatidentrennung während der Anaphase über einen BLM- bzw. Mus81-abhängigen Prozess in der Mitose aufgelöst werden. Dies sollte nach der Herunterregulierung von BLM und Mus81 in HeLa-Zellen anhand von Schwesterchromatidaustauschen (*sister chromatid exchanges* / SCEs) untersucht werden.

4.4.1 Einfluss der Herunterregulierung von BLM und Mus81 mittels siRNA auf die DSB-Reparatur

Bevor die SCE-Analysen durchgeführt wurden, sollte zunächst untersucht werden, ob die Herunterregulation von BLM und Mus81 Auswirkungen auf die Reparaturkapazität der Zelle hat. Da BLM über die Funktion der Auflösung von Chromatin-*Entanglements* hinaus noch an der Resektion von DSBs und damit an einem frühen Schritt der HR beteiligt ist (Gravel et al. 2008), könnte die Herunterregulierung das Reparaturverhalten der Zelle beeinflussen und somit die Ergebnisse der SCE-Studien verfälschen. Für die Untersuchungen sollte das DSB-Level in HeLa-Zellen mittels γ H2AX-Focianalysen und chromosomaler Bruchstudien ermittelt werden.

4.4.1.1 γ H2AX-Focianalysen in HeLa-Zellen nach der Herunterregulierung von BLM und Mus81

Um den Einfluss von BLM und Mus81 auf die DSB-Reparaturkapazität der Zelle genauer untersuchen zu können, sollte im folgenden Experiment in HeLa-Zellen nach der Herunterregulierung von BLM und Mus81 das DSB-Level anhand der γ H2AX-Foci in der G2-Phase nach Bestrahlung analysiert werden.

Für das Experiment wurden exponentiell wachsende HeLa-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und für 48 h mit siRNA gegen BLM (siBLM) und 72 h gegen Mus81 (siMus81), sowie einer nicht-komplementären Kontroll-siRNA (siCtrl) für 48 h inkubiert. Als weitere Kontrollzelllinie dienten HeLa-Zellen, die für 48 h nur mit dem Transfektionsreagenz (Mock) inkubiert wurden. Nach der Bestrahlung mit 2 Gy wurden die Zellen nach einer Reparaturzeit von 2 und 8 h fixiert und mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen γ H2AX und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Auswertung ausgeschlossen. Die gefärbten Zellen wurden am Immunfluoreszenzmikroskop im DAPI-Kanal eingescannt und die γ H2AX-Focilevel in den G2-Phasezellen manuell ausgewertet.

(Abbildung 29 B). Zur Überprüfung der Effektivität der siRNA wurden die Zellen 2 h nach der Bestrahlung mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen BLM und Mus81 und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Anschließend wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von den Zellen angefertigt und anhand der Farbintensitäten die Herunterregulierung der jeweiligen Proteine nachgewiesen.

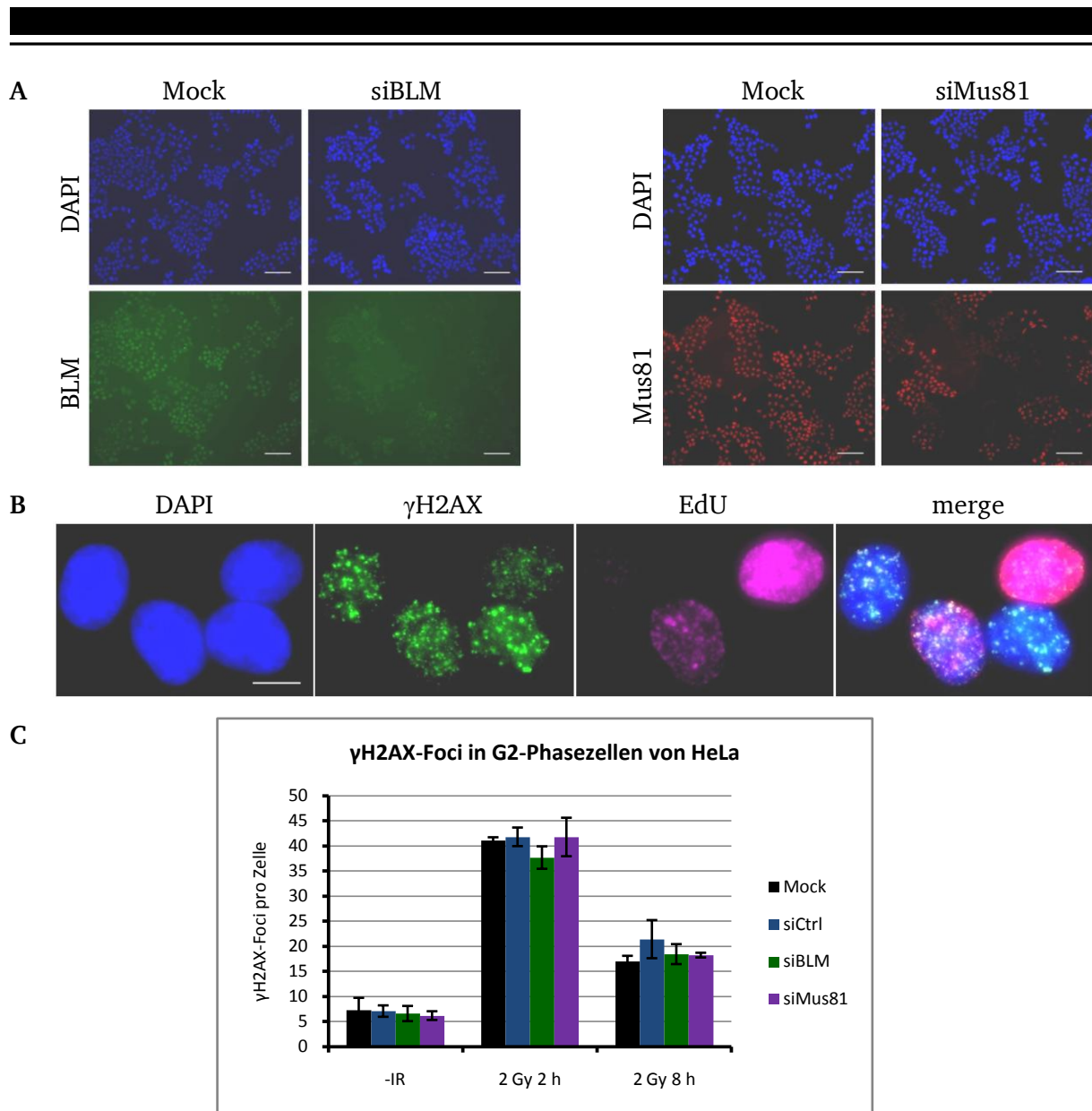


Abbildung 29: γ H2AX-Focianalysen in HeLa-Zellen nach BLM- und Mus81-Herunterregulierung und Bestrahlung mit 2 Gy.

(A) Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von BLM-siRNA (siBLM), Mus81-siRNA (siMus81) und Transfektionsreagenz (Mock) behandelten HeLa-Zellen zur Überprüfung der siRNA-Effektivität. Der Maßstab entspricht 100 μ m.

HeLa-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und für 48 h mit siBLM bzw. 72 h mit siMus81 inkubiert. Die Mock-Kontrollzellen wurde nur mit dem Transfektionsreagenz über 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt, nach 2 h fixiert und mittels Antikörper gegen BLM (grün) bzw. Mus81 (rot) und DAPI als DNA-Farbstoff (blau) gefärbt. Von den Zellen wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt und die siRNA-Effektivität anhand der Farbintensitäten der angefärbten Proteine überprüft.

(B) Exemplarische, immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen (siCtrl) mit γ H2AX-Foci (grün), EdU (magenta) und DAPI (blau) nach Bestrahlung mit 2 Gy (2 h).

(C) Graphische Darstellung der γ H2AX-Focilevel in der G2-Phase von HeLa-Zellen nach BLM- und Mus81-Herunterregulierung und nach Bestrahlung. Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und für 48 h mit siBLM bzw. 72 h mit siMus81 inkubiert. Die Mock- und siCtrl-Kontrollzellen wurden für 48 h mit einer Kontroll-siRNA (siCtrl) bzw. nur mit dem Transfektionsreagenz (Mock) inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt, nach 2 bzw. 8 h fixiert und mittels Antikörper gegen γ H2AX und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen wurden mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Auswertung ausgeschlossen. Die Zellen wurden am Immunfluoreszenzmikroskop im DAPI-Kanal eingescannt und das γ H2AX-Focilevel von G2-Phasezellen manuell ermittelt. Die Datenpunkte zeigen den Mittelwert von 3 Experimenten mit jeweils n = 40 ausgewerteten Zellen/Bedingung. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte der 3 Experimente dar.

In den immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zur Kontrolle der Wirksamkeit der eingesetzten siRNAs zeigt der Großteil der HeLa-Zellen sowohl nach der siBLM-Behandlung als auch nach der siMus81-Behandlung eine deutliche Abnahme der jeweiligen Farbintensität, was auf eine erfolgreiche Herunterregulierung von BLM bzw. Mus81 in diesen Zellen hindeutet (Abbildung 29 A). Bei den γ H2AX-Focianalysen in der G2-Phase zeigen die Mock- und siCtrl-Kontrollzellen im unbestrahlten Zustand etwa 7 γ H2AX-Foci/Zelle (Abbildung 29 C). 2 h nach Bestrahlung steigt das Focilevel auf etwa 41 bzw. 42 γ H2AX-Foci/Zelle an. 8 h nach Bestrahlung liegt es bei etwa 17 bzw. 21 γ H2AX-Foci/Zelle. Nach der Mus81-Herunterregulierung zeigen die Zellen zu jedem Zeitpunkt nahezu identische Focizahlen wie die beiden Kontrollzelllinien. Während auch bei den siBLM behandelten Zellen das γ H2AX-Focilevel im unbestrahlten Zustand und 8 h nach Bestrahlung auf dem selben Niveau der restlichen Zelllinien liegt, weisen sie 2 h nach Bestrahlung mit etwa 38 γ H2AX-Foci/Zelle ein geringfügig niedrigeres Focilevel auf.

Zusammengefasst zeigen die Daten auf γ H2AX-Fociebene keine Beeinflussung der DSB-Reparaturkapazität nach der Herunterregulation von BLM und Mus81.

4.4.1.2 Chromosomale DSB-Analysen in HeLa-Zellen nach der Herunterregulierung von BLM und Mus81

Neben der γ H2AX-Focianalyse sollte das DSB-Level nach der Herunterregulierung von BLM und Mus81 auch auf chromosomaler Bruchebene in Metaphase-Chromosomen von HeLa-Zellen untersucht werden. Das Experiment wurde so konzipiert, dass es mit der im nächsten Kapitel folgenden SCE-Analyse (Kapitel 4.4.2) kombiniert werden konnte und die anschließenden Auswertungen zeitgleich anhand der selben Präparate erfolgen konnten. Daher wird in diesem Kapitel die Versuchsdurchführung genau beschrieben.

Für das Experiment wurden exponentiell wachsende HeLa-Zellen vor der Bestrahlung für 72 h mit siRNAs gegen Mus81 (siMus81) und BLM (siBLM) inkubiert. Als Kontrollzelllinien dienen HeLa-Zellen, die über 72 h mit einer nicht-komplementären Kontroll-siRNA (siCtrl), bzw. nur mit den Chemikalien des Transfektionskits ohne siRNA (Mock) behandelt wurden. Aufgrund dessen, dass die maximale Effizienz von siBLM und siCtrl nach 48 h erreicht war und die Wirksamkeit der siRNAs mit weiterer Versuchsdauer abnimmt, wurden die Zellen nach 48 h mit siBLM bzw. siCtrl nachtransfiziert. Für die Analyse der SCE-Level wurden die Zellen mit dem Thymidin-Analogon BrdU (5-Bromo-2'-Desoxyuridin) über die Dauer von zwei Replikationszyklen (48 h) vor der Bestrahlung inkubiert. Dies sollte eine Inkorporation des BrdUs in die DNA der Zellen ermöglichen. Aufgrund der Inkubationszeit des BrdUs über zwei

Replikationszyklen resultierte daraus ein unifilar-substituiertes Chromatid, sowie ein bifilar-substituiertes Schwesterchromatid. Die Zellen wurden mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt und 6 h nach der Bestrahlung für 1 h mit Colcemid inkubiert. 7 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und die Chromosomen auf Objektträgern gespreitet. Durch die kombinierte Behandlung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (Hoechst 33258) und UV-Licht konnte nach anschließender Färbung der DNA mittels DAPI oder Giemsa der Unterschied zwischen den unifilar- und bifilar-substituierten Chromatiden sichtbar gemacht werden. In jeweils 2 der insgesamt 4 durchgeführten Experimenten wurde die DNA mittels DAPI bzw. Giemsa angefärbt. Bei den DAPI gefärbten Chromosomen wurden die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen mittels EdU markiert, gefärbt und anschließend bei der Auswertung ausgeschlossen. Dies war aus experimentellen Gründen bei den Giemsa gefärbten Chromosomen nicht möglich. Von den gespreiteten Chromosomen wurden immunfluoreszenzmikroskopische (DAPI) bzw. durchlichtmikroskopische (Giemsa) Aufnahmen angefertigt und am Computer das Chromatidbruchlevel manuell bestimmt (Abbildung 30 B). Aufgrund des variierenden Chromosomensatzes bei HeLa-Zellen wurden die erhaltenen Werte auf 70 Chromosomen normiert. Für die Überprüfung der Effektivität der eingesetzten siRNAs wurden exponentiell wachsende HeLa-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und für 72 h mit siBLM, siMus81 und ohne siRNA (Mock) inkubiert. Nach 48 h wurden die siBLM behandelten Zellen nachtransfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt, nach 2 h fixiert und mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper gegen BLM, Mus81 und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Von den Zellen wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt und anhand der Farbintensitäten der angefärbten Proteine die siRNA-Effizienz nachgewiesen.

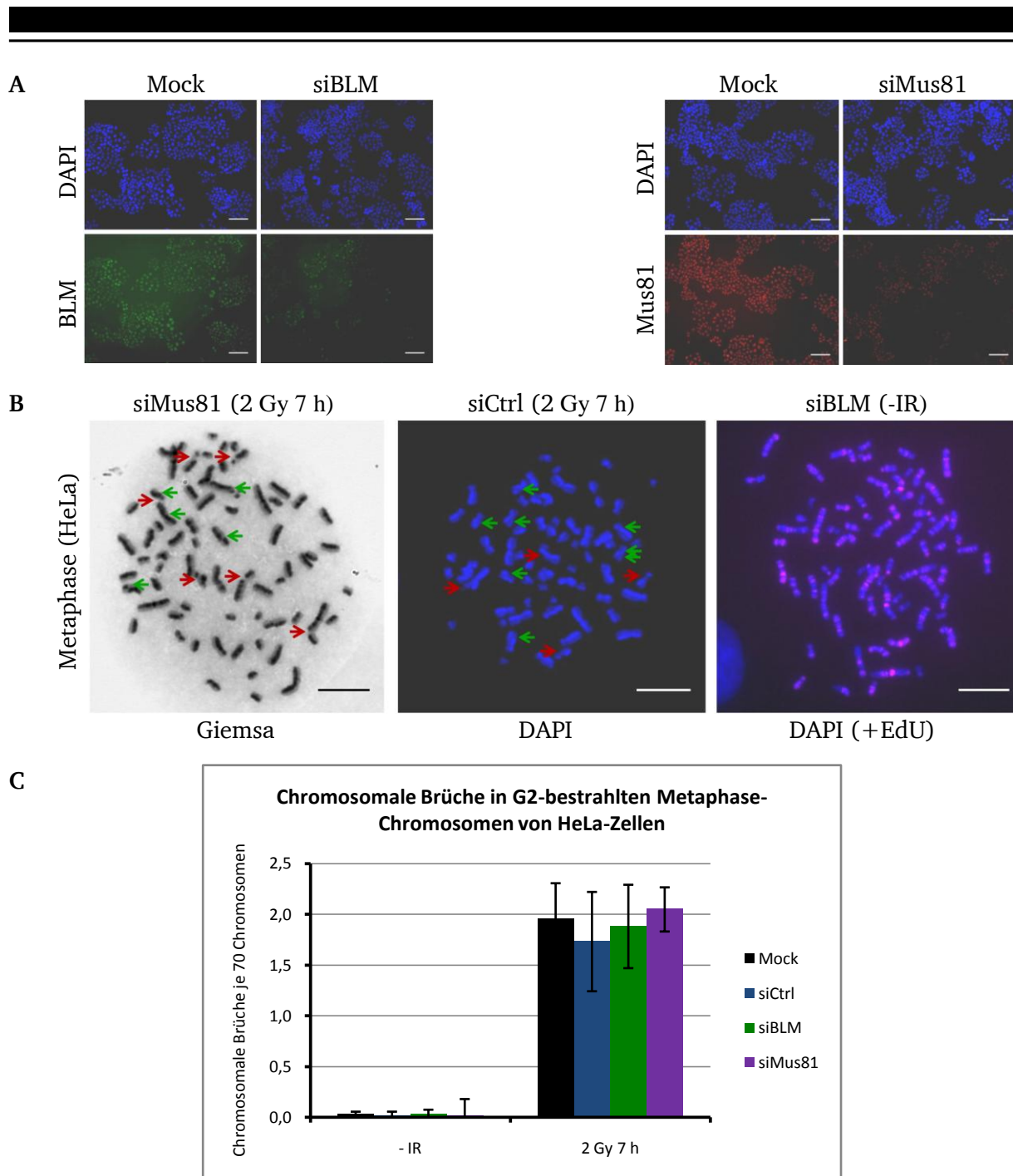


Abbildung 30: Chromatidbruchanalysen in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen von HeLa-Zellen nach Herunterregulierung von BLM und Mus81.

(A) Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von siBLM und siMus81 behandelten HeLa-Zellen zur Überprüfung der siRNA-Effektivität. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und BLM bzw. Mus81 mittels siRNA über 72 h herunterreguliert. 2 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und mittels Antikörper gegen BLM bzw. Mus81 und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Von den Zellen wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht und die siRNA-Wirksamkeit anhand der Farbtintensität der angefärbten Proteine überprüft. Der Maßstab entspricht 100 μm .

(B) Exemplarische, immunfluoreszenz- und durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Metaphase-Chromosomen von HeLa-Zellen nach siRNA-Behandlung und Bestrahlung mit Chromatidbrüchen (rote Pfeile), SCEs (grüne Pfeile) und EdU (magenta). Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden über 72 h mit siBLM, siMus81, siCtrl und ohne siRNA (Mock) inkubiert. 6 h nach einer Bestrahlung mit 2 Gy wurden die Zellen für 1 h mit Colcemid behandelt. 7 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen fixiert, die Chromosomen auf Objektträgern gespreitet und eine FpG-Färbung durchgeführt. Die DNA wurde dabei mittels DAPI oder Giemsa (je 2 Experimente) gefärbt. Bei den zwei

Experimenten, bei denen die Chromosomen mittels DAPI gefärbt wurden, wurden die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Auswertung ausgeschlossen. Dies war bei den Giemsa gefärbten Chromosomen experimentell nicht möglich. Von den Chromosomen wurden immunfluoreszenz- und durchlichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt und das Chromatidbruchlevel am Computer manuell ermittelt. Die Schwesterchromatiden zeigen sowohl im DAPI-Kanal als auch bei den Durchlichtaufnahmen unterschiedlich starke Intensitäten. Dies ist auf die für die SCE-Analysen notwendige Behandlung mit BrdU, Bisbenzimid und UV-Licht zurückzuführen.

(C) Graphische Darstellung der Chromatidbruchlevel in Metaphase-Chromosomen von HeLa-Zellen nach siBLM-, siMus81, siCtrl- und Mock-Behandlung und Bestrahlung mit 2 Gy. Die Datenpunkte zeigen den Mittelwert von insgesamt 4 Experimenten (2 x DAPI, 2 x Giemsa) mit jeweils n = 40 ausgewerteten Zellen/Bedingung. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte dar.

Sowohl nach der Inkubation mit siBLM als auch nach der Behandlung mit siMus81 ist beim Großteil der HeLa-Zellen eine deutliche Herunterregulierung von BLM bzw. Mus81 zu beobachten (Abbildung 30 A). Im Vergleich zu den DSB-Analysen auf γ H2AX-Fociebene (Abbildung 29 C) weisen alle Zelllinien unabhängig ihrer siRNA-Behandlung in den Metaphasen eine deutlich geringere Anzahl an Chromatidbrüchen als γ H2AX-Foci auf (Abbildung 30 C). Dies ist konsistent mit den Beobachtungen aus den DSB-Analysen in den CHO-Zellen (Kapitel 4.3), die zeigen, dass nicht jeder DSB auf γ H2AX-Fociebene in einen chromosomalen Bruch umgewandelt wird. Im unbestrahlten Zustand zeigen die Metaphase-Chromosomen der Mock- und siCtrl-Zellen mit $< 0,05$ Chromatidbrüchen/Zelle ein niedriges Hintergrundniveau. 7 h nach der Bestrahlung steigt dieses auf etwa 2 Brüche/Zelle an. Sowohl die siBLM behandelten Zellen als auch die Mus81 behandelten Zellen zeigen zu jedem Zeitpunkt nahezu identische Werte wie die Mock- und siCtrl-Kontrollzellen.

Somit zeigt auf chromosomaler Ebene die Herunterregulierung von BLM und Mus81 keinen Einfluss auf die Reparaturkapazität der Zellen und bestätigt damit die Ergebnisse der γ H2AX-Focianalysen (Abbildung 29).

4.4.2 Schwesterchromatidaustausche in der Mitose

Nachdem gezeigt wurde, dass die Herunterregulierungen von BLM und Mus81 keine Auswirkungen auf die DSB-Reparaturkapazitäten zu späten Zeiten nach Bestrahlung haben, sollte nun untersucht werden, ob die Auflösung der strahleninduzierten HR-Intermediate in der Mitose über einen BLM- bzw. Mus81-abhängigen Mechanismus erfolgt. Während der Prozess der Auflösung von Chromatin-*Entanglements* durch die Helikase BLM als Dissolution bezeichnet wird und zur Entstehung von *Non-crossover*-Produkten führt, spricht man bei der Mus81-abhängigen Auflösung von einer Resolution, bei deren Prozess es zum Austausch von homologen Sequenzen zwischen den beiden Schwesterchromatiden und damit zur Generierung von *Crossover*-Produkten kommt (Wu und Hickson 2003; Osman et al. 2003). Diese Schwesterchromatidaustausche (*sister chromatid exchanges* / SCEs) lassen sich mit Hilfe

einer besonderen Vorbehandlung und einer speziellen Färbemethode unter dem Mikroskop visualisieren. Hierfür wurden die Zellen über eine Dauer von 2 Zellzyklen (48 h) mit dem Thymidin-Analogon BrdU inkubiert, um eine bifilare Inkorporation zu ermöglichen. Anschließend wurden die Chromosomen mittels FpG-Färbung gefärbt und am Mikroskop Aufnahmen von den Chromosomen angefertigt. Nach der Herunterregulierung von BLM bzw. Mus81 sollten anhand der Anzahl an Farbaustauschen zwischen den Chromatiden, die ein abgeschlossenes HR-Ereignis widerspiegeln, bei dem es zu einem *Crossover* kam, Rückschlüsse gezogen werden, inwiefern die Proteine BLM und Mus81 an der Auflösung der HR-Intermediate beteiligt sind. Um analysieren zu können, ob eine mögliche Auflösung der strahleninduzierten HR-Intermediate durch BLM und Mus81 in der Mitose erfolgt, sollten zum Vergleich in einem weiteren Experiment die SCE-Level von BLM- und Mus81-defizienten Zellen in der G2-Phase ermittelt werden.

Die Auswertung erfolgte zusammen mit den Chromatidbruchanalysen (Abbildung 30) anhand der selben Präparate. Die experimentelle Durchführung ist dementsprechend dem Kapitel 4.4.1.2 zu entnehmen. Für die SCE-Analysen in der G2-Phase wurden die Zellen 6,5 h nach Bestrahlung für 30 min mit Calyculin A anstatt mit Colcemid inkubiert, wodurch eine vorzeitige Chromosomenkondensation in G2-Phasezellen induziert wurde. Von den gespreiteten Chromosomen der beiden Experimente wurden immunfluoreszenzmikroskopische (DAPI) bzw. durchlichtmikroskopische (Giemsa) Aufnahmen angefertigt (Abbildung 31 A) und am Computer die SCE-Level manuell bestimmt. Aufgrund des variierenden Chromosomensatzes bei HeLa-Zellen wurden die erhaltenen SCE-Werte auf 70 Chromosomen normiert.

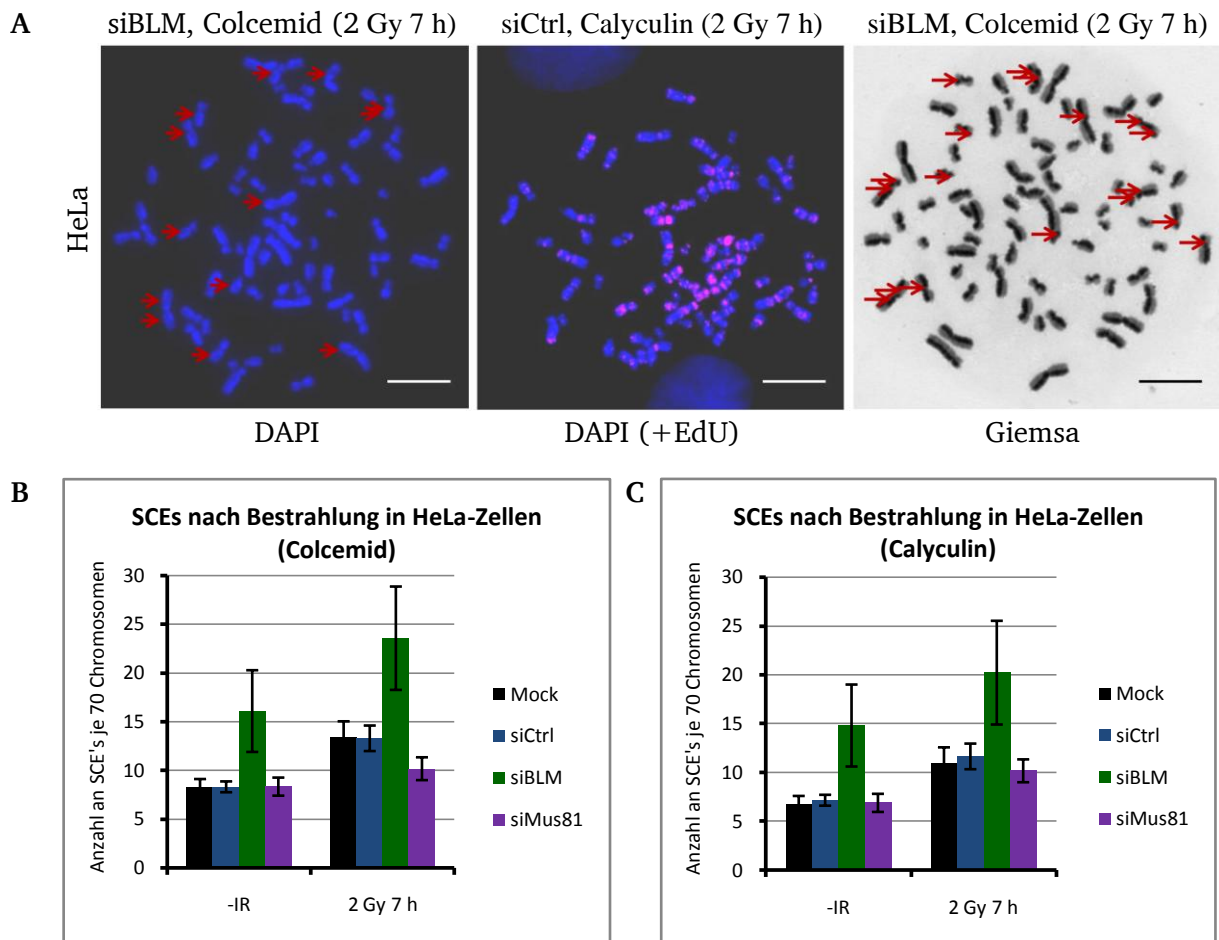


Abbildung 31: SCE-Analysen in Calyculin und Colcemid behandelten HeLa-Zellen nach BLM- und Mus81-Herunterregulierung und Bestrahlung mit 2 Gy.

(A) Exemplarische, immunfluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen von SCEs in HeLa-Zellen nach siRNA-Behandlung und Bestrahlung. Der Maßstab entspricht 10 μm .

(B + C) Graphische Darstellungen der SCE-Level in Colcemid und Calyculin behandelten HeLa-Zellen nach siCtrl-, siBLM-, siMus81- und Mock-Behandlung und Bestrahlung mit 2 Gy. Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden über 72 h mit siCtrl, siBLM, siMus81 und ohne siRNA (Mock) inkubiert. Vor der Bestrahlung mit 2 Gy wurden die Zellen über eine Dauer von 2 Replikationszyklen (48 h) mit BrdU und für 30 min mit EdU inkubiert. 1 h bzw. 30 min vor den Fixierungszeitpunkten wurden die Zellen mit Colcemid bzw. Calyculin A inkubiert. 7 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen fixiert, die Chromosomen auf Objektträgern gespreitet und eine FpG-Färbung durchgeführt. Bei jeweils zwei der insgesamt 4 Experimenten wurde die DNA mittels Giemsa bzw. DAPI gefärbt. Bei den zwei Experimenten, bei denen die Chromosomen mittels DAPI gefärbt wurden, wurden die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen mittels EdU markiert, gefärbt und bei der Auswertung ausgeschlossen. Dies war bei den Giemsa gefärbten Chromosomen experimentell nicht möglich. Von den mit DAPI gefärbten Chromosomen wurden immunfluoreszenzmikroskopische, von den mit Giemsa gefärbten Chromosomen durchlichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt und die SCE-Level am Computer manuell ermittelt. Die Datenpunkte zeigen den Mittelwert von insgesamt 4 Experimenten (2 x DAPI, 2 x Giemsa) mit jeweils $n = 40$ ausgewerteten Zellen/Bedingung. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte dar.

Nach Colcemid-Behandlung weisen die beiden unbestrahlten Kontrollzelllinien Mock und siCtrl etwa 8 SCEs/Zelle auf (Abbildung 31 B). 7 h nach der Bestrahlung steigt dieser Wert auf über 13 SCEs/Zelle an. BLM-defiziente Zellen (siBLM) zeigen nach Colcemid-Inkubation im unbestrahlten Zustand etwa 16 SCEs/Zelle. Dieser Wert steigt nach Bestrahlung auf etwa 24 SCEs/Zelle an. Bei unbestrahlten, Mus81-defizienten Zellen liegt das SCE-Hintergrundniveau nach Colcemid-Behandlung mit etwa 8 SCEs/Zelle auf gleicher Höhe mit

den Werten der beiden Kontrollzelllinien. Dagegen zeigen sie im Vergleich zu den restlichen Zelllinien 7 h nach Bestrahlung einen deutlich geringeren Anstieg des SCE-Levels auf etwa 10 SCEs/Zelle. Unbestrahlte, Calyculin behandelte Zellen der Kontrollzelllinien siCtrl und Mock zeigen ein SCE-Hintergrundlevel von etwa 7 SCEs/Zelle (Abbildung 31 C). 7 h nach Bestrahlung steigt dieses auf etwa 11 SCEs/Zelle an. Im unbestrahlten Zustand weisen die BLM-defizienten Zellen (siBLM) nach Calyculin-Inkubation mit etwa 15 SCEs/Zelle im Vergleich zu den Kontrollzelllinien ein hohes SCE-Hintergrundniveau auf, welches 7 h nach Bestrahlung auf etwa 20 SCEs/Zelle ansteigt. Das SCE-Level von siMus81 und Calyculin behandelten Zellen liegt im unbestrahlten Zustand mit etwa 7 SCEs/Zelle auf dem Hintergrundniveau der Kontrollzelllinien. 7 h nach Bestrahlung weisen die Zellen mit 10 SCEs/Zelle im Vergleich zu den Kontrollzelllinien ein geringfügig niedrigeres SCE-Level auf.

Zusammenfassend zeigen die Kontrollzelllinien Mock, siCtrl sowie die siBLM-transfizierten Zellen nach Colcemid-Behandlung mit $5,2 \pm 3,3$ SCEs/Zelle (Mock), $5,0 \pm 3,2$ SCEs/Zelle (siCtrl) und $7,5 \pm 3,3$ SCEs/Zelle (siBLM) deutlich stärkere, strahleninduzierte Anstiege der SCE-Level als die Mus81-defizienten Zellen ($1,8 \pm 2,1$ SCEs/Zelle). Im Gegensatz dazu weisen alle Zelllinien nach Calyculin-Behandlung vergleichbare, strahleninduzierte Anstiege der SCE-Niveaus auf ($4,2 \pm 2,5$ SCEs/Zelle (Mock); $4,5 \pm 1,9$ SCEs/Zelle (siCtrl); $5,4 \pm 9,5$ SCEs/Zelle (siBLM)). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Auflösung der strahleninduzierten HR-Intermediate in der Mitose über einen Mus81-abhängigen Prozess erfolgt. Vergleicht man den strahleninduzierten Anstieg der SCE-Level der Kontrollzelllinien Mock, siCtrl und der siBLM-transfizierten Zellen zwischen Calyculin und Colcemid behandelten Zellen, so zeigen diese Zelllinien nach Colcemid-Inkubation im Vergleich zu den Calyculin behandelten Zellen höhere SCE-Level. Dies legt eine vermehrte Auflösung der strahleninduzierten HR-Intermediate in der Mitose nahe. Sowohl bei den Calyculin behandelten, als auch bei den Colcemid behandelten Zellen ist nach der Herunterregulierung von BLM unter allen Versuchsbedingungen ein deutlich erhöhtes SCE-Level auszumachen. Dies ist auf die Prozessierung von Replikationsintermediaten während der S-Phase und G2-Phase zurückzuführen. Aufgrund der Herunterregulierung von BLM kann die Auflösung dieser Strukturen nicht über den bevorzugten Weg der Dissolution stattfinden (Sarbajna et al. 2014). Stattdessen wird die BLM-abhängige Prozessierung der Chromatin-Entanglements über Nuklease-abhängige Mechanismen kompensiert, welche vermehrt zur Ausbildung von SCEs führen. Aufgrund dessen, dass der Anstieg der SCEs nach der Herunterregulierung von BLM in den Colcemid behandelten Zellen etwa dem Anstieg bei den Kontrollzelllinien Mock und siCtrl entspricht, kann eine BLM-abhängige Auflösung von strahleninduzierten HR-

Intermediaten in der Mitose ausgeschlossen werden. Diese Erkenntnis deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen Beteiligung von BLM an der Auflösung von Chromatin-Entanglements in der S- und G2-Phase nach Replikationsstress (Wu und Hickson 2003; Matos et al. 2011).

4.4.3 γ H2AX-Focianalysen in G1

Abschließend sollte untersucht werden, welchen Einfluss das Durchlaufen der Mitose nach einer Bestrahlung in der G2-Phase auf das Bruchlevel in der nachfolgenden G1-Phase hat und welchen Einfluss eine Depletion von Mus81 hierbei hat. Sofern Chromatin-Entanglements nicht rechtzeitig vor der Chromatidentrennung aufgelöst werden, könnten sie durch die mechanischen Zugkräfte des Spindelfaserapparates während der Anaphase auseinandergerissen werden. Dies könnte zu neuen, komplexen DNA-Schäden führen, welche in der darauffolgenden G1-Phase zu einem erhöhten γ H2AX-Focilevel führen würde. Zu Vergleichszwecken sollte ebenfalls nach BLM-Herunterregulierung das DSB-Niveau in G2-bestrahlten G1-Phasezellen untersucht werden.

Dazu wurden exponentiell wachsende 82-6hTert-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und über 72 h mit siBLM und siMus81 inkubiert. Als Kontrollzellen dienten 82-6hTert-Zellen, die über 72 h mit einer nicht-komplementären Kontroll-siRNA (siCtrl), bzw. nur mit den Chemikalien des Transfektionskits ohne siRNA (Mock) behandelt wurden. Da die Wirksamkeit von siBLM und siCtrl nach 48 h nachließ, wurden die Zellen nach 48 h nachtransfiziert. Die Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt und nach einer Reparaturzeit von 13 und 16 h fixiert. Mit Hilfe einer zeitversetzten Doppelmarkierung von S-Phasezellen vor der Bestrahlung konnte trotz langer Reparaturzeiten eine gezielte Auswertung von G2-bestrahlten G1-Phasezellen unter Ausschluss der sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befindenden Zellen erreicht werden. Hierfür wurden die Zellen 3 h vor der Bestrahlung zunächst mit BrdU inkubiert. Alle Zellen, die sich während dieser Zeit in der S-Phase befunden hatten, bauten während der DNA-Synthese das BrdU in ihr Genom ein und konnten dadurch anschließend gefärbt und markiert werden. Einige dieser Zellen befanden sich zu Beginn der BrdU-Markierung bereits in der fortgeschrittenen S-Phase und traten während der 3-stündigen BrdU-Inkubationszeit in die darauffolgende G2-Phase ein. Durch die Zugabe des zweiten Thymidinanalogs EdU 10 min vor der Bestrahlung wurden alle Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befanden, markiert und konnten anschließend bei der Auswertung nach der EdU-Färbung ausgeschlossen werden. Die für die γ H2AX-Focianalyse relevanten, in der G2-Phase-bestrahlten G1-Phasezellen waren somit BrdU-positiv und EdU-negativ. Nach der Fixierung

wurden die Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen γ H2AX und BrdU sowie DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Ebenso wurde das eingebaute EdU angefärbt. Für die Analyse wurden die Zellen anschließend am Immunfluoreszenzmikroskop im DAPI-Kanal eingescannt und die Anzahl der γ H2AX-Foci in BrdU-positiven, EdU-negativen G1-Phasezellen manuell am Mikroskop ermittelt (Abbildung 32 B).

Zur Überprüfung der Effektivität der eingesetzten siRNAs wurden exponentiell wachsende 82-6hTert-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und für 72 h mit siBLM und ohne siRNA (Mock) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt, nach 8 h fixiert und mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper gegen BLM, Mus81 und DAPI als DNA-Farbstoff gefärbt. Von den Zellen wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt und anhand der Farbintensitäten der angefärbten Proteine die siRNA-Effizienz nachgewiesen.

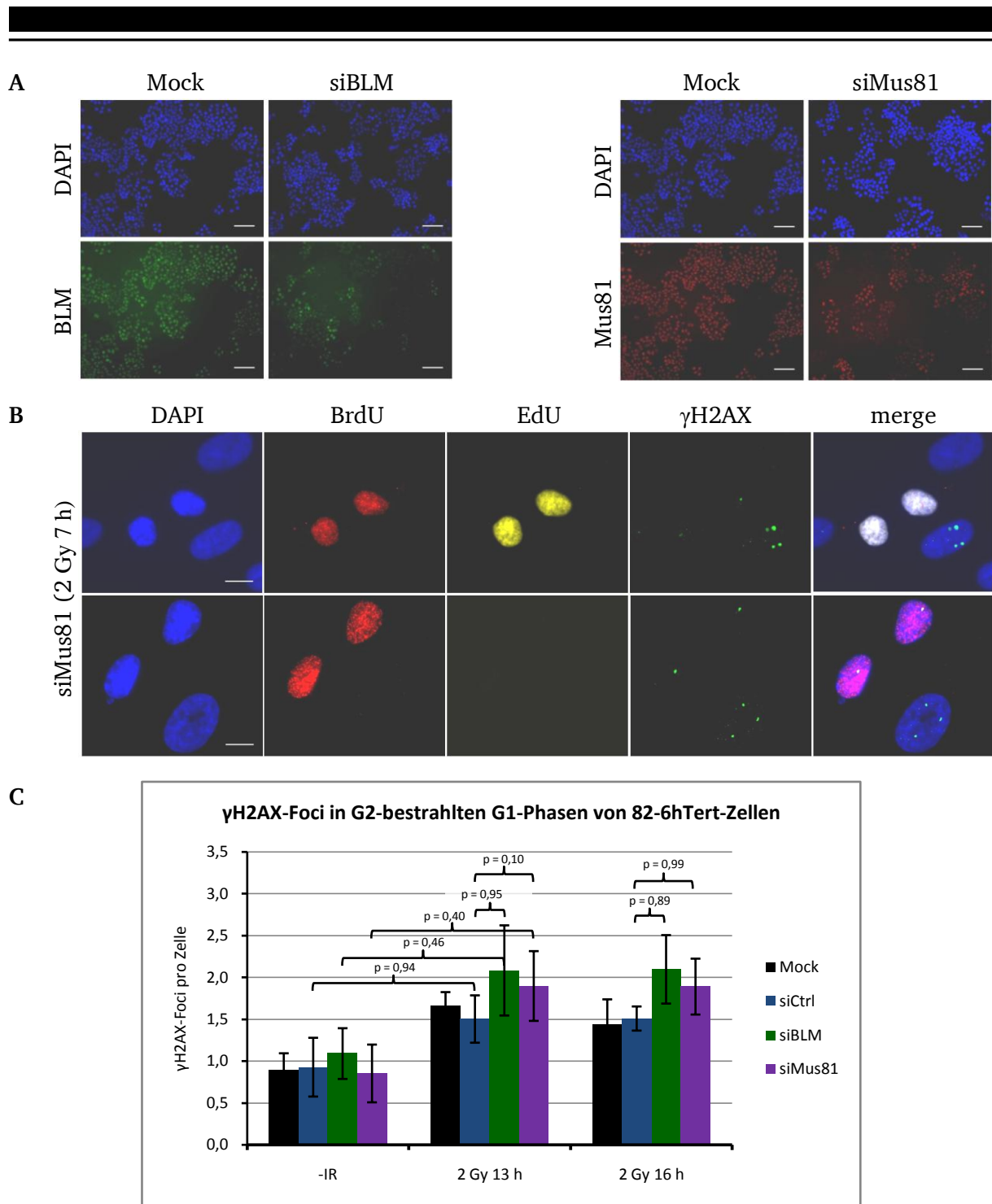


Abbildung 32: γ H2AX-Focianalysen in G2-bestrahlten G1-Phasezellen von 82-6hTert-Zellen nach Mus81- und BLM-Herunterregulierung.

(A) Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von siBLM, siMus81 und Mock behandelten 82-6hTert-Zellen zur Überprüfung der siRNA-Wirksamkeit. Exponentiell wachsende 82-6hTert-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und über 72 h mit siBLM, siMus81 und ohne siRNA (Mock) inkubiert. 8 h nach der Bestrahlung mit 2 Gy wurden die Zellen fixiert und mittels Antikörper gegen BLM (grün) und Mus81 (rot) und DAPI als DNA-Farbstoff (blau) gefärbt. Von den Zellen wurden immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt und die siRNA-Wirksamkeit anhand der Farbintensitäten der angefärbten Proteine überprüft. Der Maßstab entspricht 100 μ m.

(B) Exemplarische, immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von G2-bestrahlten G1-Phasezellen von 82-6hTert-Zellen mit γ H2AX-Foci (grün), BrdU (rot), EdU (gelb) und DAPI (blau). Der Maßstab entspricht 10 μ m.

(C) Graphische Darstellung der γ H2AX-Focilevel in G2-bestrahlten G1-Phasezellen von BLM- und Mus81-defizienten 82-6hTert-Zellen. Exponentiell wachsende 82-6hTert-Zellen wurden über 72 h mit siCtrl, siBLM, siMus81 und ohne siRNA (Mock) inkubiert. 3 h vor Bestrahlung wurden die Zellen mit BrdU und 10 min vor Bestrahlung mit EdU inkubiert. Durch die zeitversetzte Doppelmarkierung der S-Phasen konnte bei der späteren

Auswertung klar zwischen in der G2-Phase-bestrahlten und in der S-Phase-bestrahlten Zellen unterschieden werden. Anschließend wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt, nach 13 und 16 h fixiert und mittels Antikörper gegen γ H2AX und BrdU, DAPI als DNA-Farbstoff und Cy5 als EdU-Farbstoff gefärbt. Am Immunfluoreszenzmikroskop wurden die Zellen im DAPI-Kanal eingescannt und die γ H2AX-Focianzahl in G2-bestrahlten G1-Phasezellen (BrdU positiv und EdU negativ) manuell ermittelt. Die Datenpunkte der Fixierungszeitpunkte 0 h (-IR) und 16 h ergeben sich aus den Mittelwerten von 4 Experimenten mit je $n = 40$ ausgewerteten Zellen/Bedingung. Die Fehlerbalken stellen dabei den Standardfehler der Mittelwerte der 4 Experimente dar. Die Datenpunkte des Fixierungszeitpunktes 13 h ergeben sich aus den Mittelwerten von 2 Experimenten mit je $n = 40$ ausgewerteten Zellen/Bedingung. Die Fehlerbalken stellen dabei die Standardabweichung der Mittelwerte der beiden Experimente dar.

Sowohl nach der Behandlung mit siBLM als auch nach der Inkubation mit siMus81 ist beim Großteil der 82-6h Tert-Zellen eine deutliche Herunterregulierung von BLM bzw. Mus81 zu beobachten (Abbildung 32 A). Die unbestrahlten G1-Phasezellen der Mock- und siCtrl-Kontrollzellen zeigen mit etwa 1 γ H2AX-Fokus/Zelle ein niedriges Hintergrundniveau (Abbildung 32 C). 13 h nach Bestrahlung in der G2-Phase steigt das γ H2AX-Focilevel auf etwa 1,5 γ H2AX-Foci/Zelle und weist dieses Level auch zu Versuchsende nach 16 h nahezu unverändert auf. Die BLM-transfizierten Zellen (siBLM) zeigen mit etwa 1,1 γ H2AX-Foci/Zelle ein ähnlich niedriges Hintergrundniveau an γ H2AX-Foci auf wie die beiden Kontrollzelllinien. 13 h nach der Bestrahlung liegt das Bruchlevel mit etwa 2 γ H2AX-Foci/Zelle etwas höher als bei Mock und siCtrl. Dieser Wert bleibt auch 16 h nach Bestrahlung unverändert. Unbestrahlte G1-Phasezellen zeigen nach der Herunterregulation von Mus81 nahezu identische γ H2AX-Focilevel wie die Mock- und siCtrl-Kontrollzellen und siBLM. 13 h nach der Bestrahlung steigt das γ H2AX-Focilevel auf etwa 1,9 γ H2AX-Foci/Zelle und liegt damit auf einem ähnlich hohen Niveau wie das von siBLM. Im Vergleich zum 13 h-Punkt zeigt das γ H2AX-Focilevel 16 h nach Bestrahlung keinerlei Veränderungen.

Fasst man die Ergebnisse zusammen so lässt sich ein strahleninduzierter Anstieg der γ H2AX-Focizahlen in allen G2-bestrahlten G1-Phasezellen beobachten. Desweiteren ist nach Bestrahlung in den G1-Phasezellen nach der Herunterregulierung von BLM und Mus81 ein im Vergleich zu den Kontrollzellen Mock und siCtrl leicht erhöhtes γ H2AX-Focilevel zu erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass trotz des Eintretens in die Mitose mit 10 - 20 strahleninduzierten DSBs in der Mitose und/oder zu Beginn der G1-Phase Prozesse ablaufen, die zur Folge haben, dass zwar nicht alle, aber ein Großteil der ursprünglichen Brüche in der darauffolgenden G1-Phase repariert sind. Dass nach Mus81- und BLM-Depletion nur geringfügig erhöhte Focilevel auszumachen sind, zeigt, dass diese Proteine zwar eine Rolle bei der Auflösung der Schadensstrukturen spielen, darüber hinaus aber vermutlich noch weitere Nukleasen, wie beispielsweise Gen1, SLX4 und XPF, an der Reparatur der Brüche beteiligt sind. Allerdings waren weitere Untersuchungen zu deren Beteiligung an der Reparatur von



strahleninduzierten DSBs in der Mitose nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit und könnte im Rahmen von zukünftigen Projekten näher erforscht werden.

5 Diskussion

In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte in humanen Zelllinien gezeigt werden, dass der G2/M-Checkpoint nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung aktiviert wird, jedoch eine Insensitivität gegenüber DSBs aufweist und folglich G2-Phasezellen vor Abschluss der Reparatur mit unreparierten DSBs in die Mitose gelangen (Deckbar et al. 2007; Deckbar et al. 2011; Krempler et al. 2007). Da zu späten Zeiten nach Bestrahlung die Prozessierung der DSBs maßgeblich über die langsame Reparaturkomponente der HR erfolgt (Beucher et al. 2009) und diese zum Zeitpunkt der Checkpointaufhebung noch nicht abgeschlossen ist, entwickelte sich die Hypothese, dass G2-bestrahlte Zellen mit intermediären Reparaturstrukturen der HR in die Mitose eintreten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob Zellen in der Tat mit strahleninduzierten HR-Intermediaten in die Mitose eintreten. Aus den daraus gewonnenen Erkenntnissen entwickelte sich der zweite Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit, der sich mit der Frage beschäftigte, wie die strahleninduzierten, intermediären Reparaturstrukturen der HR aufgelöst werden.

In den ersten Experimenten wurden Untersuchungen zum Zusammenspiel von Zellzykluskontrolle und DSB-Reparaturverhalten in wt- und HR-defizienten Zelllinien des CHO-Systems durchgeführt, um die Hypothese zu überprüfen. Während in humanen Zellen eine langfristige Inhibierung von Rad51 letal ist und nur für kurze Zeiten durch die Behandlung mit siRNAs oder chemischen Inhibitoren erreicht werden kann, bieten die HR-Mutanten 51d1 und irs1SF den Vorteil einer dauerhaften Inhibierung der HR durch eine stabile, biallele Deletion des Rad51 Paralogs *51d1* bzw. *xrcc3*. Zur Verifizierung der gewonnenen Daten sowie für die nachfolgenden Untersuchungen zur Auflösung der HR-Strukturen wurden die anschließenden Experimente in humanen Zellen durchgeführt.

5.1 Einfluss von HR-Faktoren auf den G2/M-Übergang

Der bei den Zellzyklusanalysen beobachtete, strahleninduzierte Rückgang des mitotischen Index (Abbildung 15, Abbildung 16) belegt in CHO-Zellen eine rasche Aktivierung des G2/M-Checkpoints nach Bestrahlung. In Verbindung mit den Beobachtungen der DSB-Reparaturanalysen in der G2-Phase (Abbildung 17) konnte in CHO wt-Zellen nachgewiesen werden, dass der G2/M-Checkpoint zu Zeiten aufgehoben wird, zu denen die DSB-Reparatur über den Mechanismus der HR noch nicht abgeschlossen ist. Desweiteren wiesen G2-Phase- und Metaphasezellen bei gleichen Fixierungszeitpunkten zu späten Zeiten nach Bestrahlung nahezu identische γ H2AX-Focilevel auf (Abbildung 17, Abbildung 18), was eine Insensitivität

des G2/M-Checkpoints gegenüber unreparierten DSBs bezeugt. Damit bestätigen die im Rahmen dieser Arbeit im CHO-System gewonnenen Erkenntnisse frühere Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe, die in humanen Zellen eine Insensitivität des G2/M-Checkpoints gegenüber DSBs nach Bestrahlung sowie die daraus resultierende Existenz von DSBs in den verschiedenen Phasen der darauffolgenden Mitose postulieren (Deckbar et al. 2007; Deckbar et al. 2011; Krempler et al. 2007).

Darüber hinaus konnte in den G2/M-Checkpointanalysen (Abbildung 15, Abbildung 16) gezeigt werden, dass die HR-Mutanten 51d1 und irs1SF im Vergleich zum wt AA8 sowohl einen generell geringeren MI als auch ein vermindertes Absinken des MI nach Bestrahlung aufwiesen. Dies lässt darauf schließen, dass die Herunterregulierung von HR-Faktoren einen Einfluss auf das G2/M-Checkpointverhalten der Zelle hat. Für das verminderte Absinken des MI sind zwei Erklärungsansätze denkbar. Zum Einen könnte dies auf eine ineffiziente Aktivierung des G2/M-Checkpoints hinweisen, die auf die Depletion von *rad51d* und *xrcc3* und damit möglicherweise auf die fehlende Ausbildung eines funktionsfähigen Rad51-Nukleoproteinfilaments zurückzuführen ist. Durch eine ineffiziente Aktivierung des G2/M-Checkpoints würden auch zu frühen Zeiten nach Bestrahlung nicht alle geschädigten Zellen in der G2-Phase arretiert werden und weiterhin in die Mitose eintreten. Die Annahme über eine gestörte G2/M-Checkpointaktivierung in Rad51-defizienten Zellen deckt sich mit den Beobachtungen einer früheren Arbeit, die über 51D1 und irs1SF hinaus auch bei weiteren HR-Mutanten des CHO-Zellsystems eine Beeinflussung des G2/M-Checkpointverhaltens postuliert (Soni 2010). Weiter wird die Annahme einer ineffizienten Aktivierung des G2/M-Checkpoints durch die Ergebnisse einer jüngeren Forschungsarbeit untermauert, die gezeigt haben, dass nicht nur die Depletion von *rad51d*, sondern auch die Herunterregulierung anderer Rad51-Paraloge sowie weiterer HR-Faktoren in CHO-Zellen dazu führt, dass die Zellen eine strahleninduzierte G2/M-Checkpointaktivierung umgehen und mit DSBs in die Mitose gelangen (Kostyrko et al. 2015). Weiter konnte jene Arbeit den Rad51-Paralogen Rad51B, Rad51C sowie den HR-Faktoren CtIP und Rad50 eine Beteiligung an der Regulation des G1-Checkpoints nachweisen. In Abwesenheit der jeweiligen Faktoren war ein vermehrter Eintritt der Zellen in die nicht-proliferierende G0-Phase zu beobachten. In Verbindung mit der in dieser Arbeit beobachteten ineffizienten G2/M-Checkpointaktivierung könnte dies einen weiteren Mechanismus zur Sicherung der genomischen Integrität der Zelle darstellen. Zwar gelangen G2-Phasezellen zunächst durch die ineffiziente Checkpointaktivierung mit unreparierten Brüchen in die Mitose, wodurch die Schäden an die Tochterzellen weitergegeben werden, jedoch könnten die geschädigten Tochterzellen anschließend durch

den Eintritt in die G0-Phase vor dem Durchlaufen einer weiteren Zellzyklusrunde zurückgehalten werden. Die G0-Phase könnte den Zellen ausreichend Zeit für die Reparatur der DSBs, die aufgrund der Abwesenheit essentieller HR-Faktoren nicht über die HR während der G2-Phase stattfinden konnte, gewähren und nun über den Mechanismus des NHEJ erfolgen. Die Zellen könnten nach einer erfolgreichen Reparatur ggf. wieder in die G1-Phase und damit in eine neue Zellzyklusrunde entlassen werden oder im Falle von irreparablen Schäden weiter in der G0-Phase arretiert bleiben.

Zum Anderen könnte die Inhibierung von essentiellen HR-Faktoren auch zu Problemen beim Durchlaufen der Mitose führen und dadurch die Dauer der Mitose verlängern, was ebenfalls das Auftreten von mitotischen Zellen nach der Checkpointaktivierung und damit den nur leicht sinkenden MI bei den HR-Mutanten begründen würde. Hinweise auf eine Beeinflussung der Dauer der Mitose sowie der übrigen Zellzyklusphasen durch die Deletion von unterschiedlichen HR-Faktoren konnten bereits frühere Arbeiten liefern (Griffin et al. 2000; Fuller und Painter 1988; Tebbs et al. 1995; Rodrigue et al. 2013). Ebenso konnte auch in Rad51-defizienten CHO-Zellen auf eine verlängerte Zellzyklusdauer geschlossen werden (Kostyrko et al. 2015).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der MI zunächst anhand von pH3-positiven Zellen ermittelt (Abbildung 15), wodurch alle mitotischen Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung detektiert wurden. Sofern jedoch die Deletion der HR-Faktoren in den CHO HR-Mutanten zu Problemen beim Durchlaufen der Mitose und dementsprechend zu einer verlängerten Mitosedauer führt, würde dies zu einem erhöhten MI führen, ihn dadurch verfälschen und somit keine genauen Rückschlüsse auf das G2/M-Checkpointverhalten zulassen. Daher wurde der MI zusätzlich mit Hilfe einer weiteren Methode bestimmt. Dabei wurde der MI im Rahmen der Lebendzellmikroskopie anhand der direkten Zellteilung (Cytokinese) ermittelt (Abbildung 16). Aufgrund der Tatsache, dass auch mit Hilfe der Lebendzellmikroskopie in HR-Mutanten nur ein schwaches Absinken des MI nach Bestrahlung zu beobachten war, bekräftigte dies die Annahme einer ineffektiven G2/M-Checkpointaktivierung in Zellen mit depletierten, essentiellen HR-Faktoren.

Da sowohl bei den HR-Mutanten als auch beim wt der G2/M-Checkpoint etwa zu gleichen Zeiten nach Bestrahlung wieder aufgehoben wird und im Rahmen der Lebendzellmikroskopie nur die Anzahl der Zellteilungen und nicht die exakte Dauer der jeweiligen Mitosen gemessen wurde, kann in Bezug auf eine verlängerte Mitosedauer nach der Depletion von HR-Faktoren in dieser Arbeit keine genauere Aussage getroffen werden. Somit stellt die Erforschung des Einflusses von HR-Faktoren auf die Mitosedauer einen vielversprechenden Ansatz für weitere Untersuchungen dar.

Zusammenfassend und im Einklang mit der aktuellen Literatur lässt sich aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen der Zellzyklusanalysen schlussfolgern, dass einige HR-Faktoren neben ihrer Funktion bei der DSB-Reparatur auch eine Rolle bei der Aktivierung des G2/M-Checkpoints und damit bei der Zellzykluskontrolle spielen. Wie die HR-Faktoren genau in der Checkpoint-Signalkaskade involviert sind und mit welchen Proteinen sie dabei interagieren ist aktuell jedoch noch nicht bekannt. So könnte die Blockierung der HR zu bestimmten Teilschritten zu einer Unterbrechung des G2/M-Checkpoint-Signallings führen, was eine Aufhebung des G2/M-Checkpoints zur Folge hätte und G2-Phasezellen in die Mitose entlassen würde. Die genaue Erforschung des Einflusses von HR-Faktoren auf die Regulation des Zellzyklus sowie die Identifizierung potentieller Wechselwirkungspartner innerhalb der Checkpoint-Signalkaskaden bietet somit einen interessanten Anhaltspunkt für zukünftige Studien.

5.2 Die Existenz von intermediären Reparaturstrukturen der HR in der Mitose

Dass der G2/M-Checkpoint auch in CHO-Zellen nach Bestrahlung zu Zeiten aufgehoben wird, zu denen die Reparatur über den Prozess der HR noch aktiv ist (Abbildung 15 - Abbildung 17), untermauert die Hypothese, dass G2-Phasezellen mit intermediären Reparaturstrukturen der HR in die Mitose eintreten. Weiter wird die Hypothese durch die Beobachtung einer weiteren, aktuellen Studie unserer Arbeitsgruppe bekräftigt, die nach Bestrahlung von humanen Zellen mit Rad52 einen HR-Faktor an DSBs in mitotischen Zellen nachweisen konnte (Taubmann 2015). Aufgrund der Beteiligung von Rad52 an dem Prozess des *second-end capture* während der HR (Nimonkar et al. 2009) könnte dies ein Hinweis auf die Existenz von resektierten, einzelsträngigen Bereichen und D-Loops sein, welche ein typisches Merkmal von intermediären Reparaturstrukturen der HR darstellen. Darüber hinaus konnte jene Arbeit weiter zeigen, dass Rad52 in der G2-Phase mit γ H2AX und in der frühen Mitose zusätzlich mit der Endonuklease Mus81 kolokalisiert. In Verbindung mit der in Abbildung 31 nachgewiesenen Beteiligung von Mus81 an der Auflösung von strahlen-induzierten Chromatin-*Entanglements*, untermauern diese Ergebnisse, dass der G2/M-Checkpoint nach Bestrahlung vor Abschluss der DSB-Reparatur wieder aufgehoben wird und Zellen mit intermediären Reparaturstrukturen der HR in die Mitose eintreten. Nachfolgend sollte näher untersucht werden, um welche Strukturen es sich dabei genau handelt.

Da eine Visualisierung der Strukturen aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens von optischen Mikroskopen nicht möglich ist, sollte anhand von indirekten Hinweisen Rückschlüsse auf die entsprechenden Strukturen gezogen werden. Ein Ansatz dafür lieferte

der Vergleich der strahleninduzierten DSB-Level auf γ H2AX-Foci- und Chromatidbruchebene von CHO wt- und HR-defizienten Zellen (Abbildung 18, Abbildung 19). Bei den Untersuchungen zeigten Metaphasezellen vom wt AA8 deutlich höhere γ H2AX-Focilevel als Chromatidbruchlevel nach Bestrahlung und bestätigten damit die Annahme sowie die Ergebnisse früherer Arbeiten, dass nicht jeder DSB im Zuge der Chromosomenkondensation zu einem chromosomalen Bruch wird (Deckbar et al. 2007; Löbrich et al. 2010; Cornforth und Bedford 1993). Im Gegensatz dazu wiesen Metaphasezellen der HR-defizienten CHO-Zelllinien 51d1 und irs1SF auf chromosomaler Ebene nur ein geringfügig niedrigeres, strahleninduziertes Bruchlevel auf als auf γ H2AX-Fociebene. Aus diesen Beobachtungen heraus konnte den HR-Intermediaten eine stabilisierende Wirkung nahegelegt werden. Die durch den DSB voneinander getrennten DNA-Abschnitte könnten dabei durch die Ausbildung von D-Loops und Holliday Junctions während der HR zusammengehalten werden. Dies könnte im Zuge der Chromatinkondensation die Generierung von Chromatidbrüchen unterbinden und damit die Chromosomen vor einer Fragmentierung bewahren. Dagegen bliebe bei HR-defizienten Zellen eine Stabilisierung der DSBs aus, woraus deren hohe chromosomale Bruchlevel in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen resultieren. Somit legen die Beobachtungen nahe, dass G2-Phasezellen nach Bestrahlung mit intermediären Reparaturstrukturen der HR in Form von D-Loops und Holliday Junctions in die Mitose eintreten.

Chromosomale Brüche stellen eine Gefährdung der genomischen Integrität der Zelle dar, da sie zu azentrischen Fragmenten führen, welche keine Centromere mehr besitzen. Folglich können diese DNA-Moleküle auch nicht während der Mitose durch den Spindelfaserapparat gebunden und aktiv zu den entsprechenden Zellpolen transportiert werden. Sofern die azentrischen Chromatidfragmente nicht zufällig während der Anaphase auf die Tochterzelle verteilt werden, kommt es zur Ausbildung der sogenannten Mikronuklei und damit zum Verlust der genetischen Information (Cornforth und Goodwin 1991). Als Folge wäre eine fehlerhafte, ungleichmäßige Verteilung des Erbguts auf die jeweiligen Tochterzellen zu nennen, die letztlich zu einer schweren Schädigung der Zelle führen kann. Somit könnten die intermediären Reparaturstrukturen der HR die strahleninduzierte Generierung von azentrischen Chromatidfragmenten sowie den damit verbundenen Verlust von genetischen Informationen verhindern und dadurch einen entscheidenden Beitrag zur Sicherung der genomischen Integrität der Zelle leisten.

Aus dem Nachweis von HR-Intermediaten in der Mitose entwickelte sich die Frage, was im Hinblick auf die Chromatidentrennung mit den stabilisierenden, intermediären Reparaturstrukturen der HR passiert, da die weitere Reparatur aufgrund der generellen

Inhibierung der DSB-Reparatur während der Mitose unterbunden ist (Orthwein et al. 2014; Lee et al. 2014) und Chromatin-*Entanglements* ebenfalls zu Problemen bei der Segregation führen können. Dieser Anhaltspunkt stellte den zweiten Forschungsschwerpunkt der Arbeit dar und wird ab Abschnitt 5.5 diskutiert.

5.3 Auswirkung unreparierter HR-Strukturen in der Mitose auf das Chromosomenbruchlevel

Aufgrund der inhibierten DSB-Reparatur während der Mitose (Orthwein et al. 2014; Lee et al. 2014) stellte sich die Frage, welche Auswirkung die Existenz von intermediären Reparaturstrukturen der HR, wie D-Loops und Holliday Junctions, im Hinblick auf die Chromatidentrennung während der Anaphase hat. Die Tatsache, dass es bei den wt-Zellen im Gegensatz zu den HR-Mutanten zu einem strahleninduzierten Anstieg des γ H2AX-Focilevels von Meta- zu Anaphase kam (Abbildung 20), deutete zunächst darauf hin, dass es beim wt im Zuge der Segregation zur Generierung von neuen DSBs kommt. Demnach könnte es durch die mechanischen Zugkräfte der Spindelfasern zu einem Auseinanderreißen der Chromatin-*Entanglements* und damit zur Entstehung neuer DSBs kommen. Diese Annahme sollte anschließend anhand von Chromatidbruchanalysen bestätigt werden. Entgegen den Erwartungen und den Ergebnissen der γ H2AX-Focianalysen (Abbildung 20) konnte den wt-Zellen auf chromosomaler Ebene jedoch kein strahleninduzierter Anstieg des Chromatidbruchlevels von Meta- zu Anaphase nachgewiesen werden (Abbildung 21). Damit widerlegten die chromosomalen Studien die anfängliche Annahme, dass es im Zuge der Chromatidentrennung während der Anaphase zu einer Generierung von neuen DSBs kommt. Während wt-Zellen und HR-Mutanten in der Anaphase vergleichbar hohe, strahleninduzierte γ H2AX-Focilevel aufwiesen (Abbildung 20), zeigte der wt auf chromosomaler Bruchebene ein deutlich geringeres strahleninduziertes Bruchlevel als die HR-Mutanten (Abbildung 21). Im Gegensatz zum wt war damit bei den HR-Mutanten zwischen der Anzahl der γ H2AX-Foci und der Chromatidbrüchen nur eine geringe Differenz auszumachen. Dies ließ darauf schließen, dass in den G2-bestrahlten Anaphasezellen des wt nicht jeder γ H2AX-Focus einen DSBs repräsentiert, sondern dass es sich dabei bei einigen γ H2AX-Foci lediglich um ein Phosphorylierungssignal handeln könnte. Gemeinsam mit den bereits diskutierten Ergebnissen der Untersuchungen zum Zusammenspiel von G2-Checkpointverhalten und DNA-Reparatur, die gezeigt haben, dass Zellen mit unreparierten DSBs in die Mitose eintreten (Kapitel 5.2), konnte das nachfolgende, hypothetische Modell erstellt werden, welches eine mögliche Erklärung für das Auftreten zusätzlicher γ H2AX-Fociwerte bei wt-Zellen lieferte: In

der G2-Phase bestrahlte Zellen könnten aufgrund der Insensitivität des G2/M-Checkpoints mit unreparierten DSBs in die Mitose eintreten. Da zum Zeitpunkt der vorzeitigen Aufhebung des G2/M-Checkpoints die Reparatur der DSBs über den Mechanismus der HR noch nicht abgeschlossen ist, könnten die Zellen mit intermediären Reparaturstrukturen wie D-Loops und Holliday Junctions in die Mitose gelangen. Diese Strukturen könnten auf die DSBs stabilisierend wirken und dadurch im Zuge der Chromosomenkondensation während der Mitose deren Umwandlung in Chromatidbrüche verhindern. Bedingt durch die räumliche Annäherung der beiden Schwesterchromatiden während der Stranginvasion und Homologiesuche, käme es zu frühen Zeiten der HR zu einer Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals des geschädigten Stranges auf den intakten Schwesterstrang. Dabei invadiert das mit Rad51 beladene 3'-Bruchende nach abgeschlossener Resektion und Ausbildung des Rad51-Nukleoproteinfilaments das intakte Schwesterchromatid, um nach der homologen Sequenz für die weitere Prozessierung der DSBs zu suchen. In Folge dessen könnte sich der *downstream* vom 3'-Bruchende befindliche Chromatidabschnitt über eine unbestimmte Länge an das intakte Schwesterchromatid annähern. Dadurch könnten die H2AX-Histone auf dem intakten Strang in den Aktionsradius der auf dem geschädigten Strang lokalisierten ATM-Kinasen gelangen, die nach der DSB-Erkennung zur Bruchstelle rekrutiert wurden und die zum DSB benachbarten H2AX-Histone über einen Bereich von mehreren Megabasenpaaren phosphorylieren. Auf diese Weise würden auch die H2AX-Histone des intakten Schwesterchromatids, welche sich infolge der Stranginvasion nun in unmittelbarer räumlichen Nähe zu den bereits phosphorylierten Histonen der Bruchregion befänden, phosphoryliert werden und als zweiter γ H2AX-Focus erscheinen. Aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens des Immunfluoreszenzmikroskops wäre in der Metaphase von fixierten Zellen eine genaue Differenzierung von eng beieinanderliegenden γ H2AX-Foci nicht möglich, wodurch der γ H2AX-Doppelfocus zu diesem Zeitpunkt nur als einzelner γ H2AX-Focus detektierbar wäre. Erst nach der Trennung der Chromatiden während der Anaphase wäre ein Doppelfocus zu beobachten, was den Anstieg des γ H2AX-Focilevels beim wt von Meta- zu Anaphase erklären würde. Vor der Chromatidentrennung würden die HR-Intermediate aufgelöst werden, wodurch die Entstehung neuer, komplexer DSBs durch ein Auseinanderreißen dieser Strukturen durch den Spindelfaserapparat verhindert werden würde. Die auf das Schwesterchromatid übertragenen H2AX-Phosphorylierungssignale blieben aufgrund ihrer allmählichen Dephosphorylierung nach der Trennung der Chromatiden noch für einen bestimmten Zeitraum detektierbar, verschwänden aber vor dem γ H2AX-Focus des geschädigten Stranges, da die H2AX-Histone des intakten Stranges nur über einen

kleineren Abschnitt durch die vor und hinter dem Bruch lokalisierten Kinasen phosphoryliert werden würden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde dieses Modell anhand von zwei Forschungsschwerpunkten überprüft. Der erste Schwerpunkt befasste sich mit der Untersuchung der Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals. Der zweite Fokus lag auf der weiteren Prozessierung der HR-Intermediate in Hinblick auf die bevorstehende Chromatidentrennung.

5.4 Mechanismus zur Generierung der paarigen γ H2AX-Foci

Aufgrund der Beobachtungen, dass in G2-bestrahlten CHO wt-Zellen ein Anstieg des γ H2AX-Focilevels von Meta- zu Anaphase nach Bestrahlung zu verzeichnen war (Abbildung 20) während dieser Anstieg auf Chromatidbruchebene ausblieb (Abbildung 21), entwickelte sich die Hypothese, dass es zu frühen Zeiten der HR im Zuge der Stranginvasion zu einer Übertragung des γ H2AX-Schadenssignals vom geschädigten Strang auf den intakten Strang kommt (siehe Kapitel 5.3). Da in fixierten Zellen aufgrund des limitierten Auflösungsvermögens der Immunfluoreszenzmikroskope eine Differenzierung zwischen einzelnen und eng nebeneinander liegenden, paarigen γ H2AX-Foci zu frühen Zeiten der Mitose nicht möglich war, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Methode in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Diese ermöglichte es auch zu frühen Zeiten der Mitose zwischen Einzel- und Doppelfoci unterscheiden zu können und darüber hinaus die genaue Position der Foci auf den Chromosomen lokalisieren zu können. Hierfür wurde in Anlehnung an die Arbeit von Cesare et al. die Methode der Immunfluoreszenzfärbung mit der Chromosomenspreitung kombiniert, um γ H2AX-Foci auf den kondensierten, gespreiteten und klar voneinander unterscheidbaren Schwesterchromatiden detektieren zu können (Cesare et al. 2009).

Betrachtet man nur die Aufnahmen der chromosomalen Spreitungen (Abbildung 22), so lassen sie zunächst die naheliegendste Vermutung zu, dass es sich bei den paarigen γ H2AX-Foci um zwei voneinander unabhängige DSBs handeln könnte, welche zufällig in beiden Schwesterchromatiden gegenüberliegend auf gleicher Höhe auftreten. Da jedoch bei den Aufnahmen auf chromosomaler Ebene keine zwei gegenüberliegende Chromatidbrüche nachgewiesen werden konnten und die Annahme im Widerspruch mit den Ergebnissen der DSB-Analysen auf γ H2AX-Foci- und Chromatidbruchebene (Abbildung 18 - Abbildung 21) steht, die eine Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals nahelegen, wurde diese Erklärung schnell wieder verworfen. Ebenso könnte es sich um eine Ansammlung von zahlreichen DSBs auf engem Raum, sogenannten *clustered breaks*, handeln, deren jeweilige H2AX-Phosphorylierungssignale aufgrund des limitierten Auflösungsvermögens des

Mikroskops und der engen Lage der DSBs zueinander nicht voneinander unterschieden werden können und als ein großer Doppelfoci erscheinen. Doch die Tatsache, dass die Induktion von *clustered breaks* allein auf der Wechselwirkung von Strahlung mit Materie beruht und dementsprechend in HR-Mutanten in gleichem Ausmaß wie bei wt-Zellen zu beobachten sein müsste, spricht gegen diese Theorie. Außerdem wird eine Entstehung von konzentrierten *clustered breaks* überwiegend durch Strahlungsarten mit einem großen linearen Energietransfer (LET), wie beispielsweise durch die Bestrahlung mit Schwerionen, erreicht, während die hier verwendete Röntgenstrahlung nur einen geringen LET aufweist und hauptsächlich über das Genom verstreute, isolierte DNA-Schädigungen wie einzelne DSBs, Einzelstrangbrüche und Basenschädigungen induziert (Asaithamby et al. 2011). Zudem wurden die DSBs in der G2-Phase induziert. Es ist unsicher, ob die Chromatiden in dieser Phase so nahe beieinander liegen, dass beide Chromatiden an derselben Stelle einen Bruch erfahren. Daher wurde die Hypothese der Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals weiter verfolgt.

Die Tatsache, dass nicht nur der CHO wt, sondern auch die HR-Mutanten in G2-bestrahlten Metaphasen paarige γ H2AX-Foci aufwiesen (Abbildung 22), lieferte keinen konkreten Hinweis auf eine HR-abhängige Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals. Zwar wies der wt im Vergleich zu den HR-Mutanten ein geringfügig erhöhtes Level an paarigen γ H2AX-Foci auf, welches jedoch nicht signifikant war. Außerdem würde im Falle einer HR-abhängigen Generierung beim wt im Vergleich zu den HR-Mutanten, bei denen aufgrund des inhibierten Stranginvasionsschrittes eine Übertragung des Phosphorylierungssignals unterbunden sein sollte, ein weitaus höheres paariges Fociniveau erwartet werden. Zudem könnte beim wt die Anzahl der Doppelfoci durch die unerklärt hohe Gesamtfocianzahl, die gleichzeitig für das Ausbleiben des Reparaturdefektes bei den HR-Mutanten sorgte, überschätzt werden und somit ebenfalls gegen eine HR-abhängige Doppelfocigenerierung sprechen.

Bei den Auswertungen der Chromosomenpräparate fiel auf, dass die paarigen γ H2AX-Foci bei den CHO-Zelllinien bevorzugt an Chromosomenenden auftraten (Abbildung 23). Dies führte zunächst zu der Annahme, dass es sich dabei um strahleninduzierte Schädigungen der Telomer-Strukturen handeln könnte. Um dies zu untersuchen, wurde eine weitere neue Methode in unserem Labor etabliert. Hierfür wurden zusätzlich zu den γ H2AX-Foci die Telomer-Regionen mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) auf den gespreiteten Chromosomen markiert. Mit dieser Methode konnte allerdings nachgewiesen werden, dass es sich bei den strahleninduzierten und an den Chromosomenenden lokalisierten γ H2AX-Doppelfoci nicht um geschädigte Telomere, sondern um typische DSBs oder

Isochromatidbrüche handelt. Dies wurde dadurch gezeigt, dass die Telomer-Sequenzen der CHO-Zellen im Gegensatz zu den am Chromosomenende liegenden Telomere der humanen Zellen, hauptsächlich mittig auf den Chromosomen lokalisiert sind und nur sehr selten mit γ H2AX-Foci kolokalisieren (Abbildung 24). Somit bestätigen die Beobachtungen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die eine interstitielle Lokalisation der Telomer-Sequenzen nahe der Centromerregion der Chromosomen von CHO-Zellen beschreiben (Balajee et al. 1994). Demzufolge handelt es sich bei den an den Chromosomenenden lokalisierten, endständigen γ H2AX-Foci um Brüche.

Bei den γ H2AX-Focianalysen auf gespreiteten Metaphase-Chromosomen von CHO-Zellen war aufgrund der starken Schwankungen zwischen den jeweiligen Einzelexperimenten sowie durch das beim wt unerwartet niedrige Level an paarig auftretenden γ H2AX-Foci eine genaue Aussage bzgl. einer möglichen, HR-abhängigen Generierung der Doppelfoci problematisch, weshalb der Versuch in humanen Zellen wiederholt wurde. Doch auch in den G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen von HeLa-Zellen konnte nur ein sehr niedriges Level an paarigen γ H2AX-Foci beobachtet werden (Abbildung 25), welches in Bezug zur Gesamtfocianzahl auf einem vergleichbar niedrigem Niveau lag wie das der HR-Mutanten der CHO-Zellen (Abbildung 22). Die Ursache dafür könnte zum Einen ein zu spät gewählter Fixierungszeitpunkt gewesen sein, zu dem die Reparatur über die HR bis auf wenige Ausnahmen schon abgeschlossen war. Folglich wären die intermediären Reparaturstrukturen der HR bereits aufgelöst gewesen und die H2AX-Histone der intakten Stränge hätten wieder dephosphoryliert vorgelegen. Dabei wäre es möglich, dass mit fortschreitender Reparatur die Dephosphorylierung der H2AX-Histone des intakten Stranges vor der des ursprünglich geschädigten Stranges abgeschlossen ist. Dies wäre darauf zurückzuführen, dass es auf dem intakten Chromatid zu keiner aktiven Rekrutierung von ATM-Kinasen kommt, sondern die H2AX-Histone im Zuge der Stranginvasion lediglich in den Aktionsradius der auf dem geschädigten Strang lokalisierten ATM-Kinasen gelangen und phosphoryliert werden. Jedoch würde im Vergleich zum geschädigten Chromatid die H2AX-Phosphorylierung des intakten Chromatids nur über einen kürzeren Bereich erfolgen, weshalb der daraus resultierende γ H2AX-Focus eine geringere Intensität aufweisen würde. Somit könnte es sich bei einigen der bei der Auswertung als einzeln auftretend gewerteten γ H2AX-Foci kurz zuvor noch um Doppelfoci gehandelt haben, was die tatsächliche Anzahl der Doppelfoci herabsetzen würde. Zum Anderen könnte das geringe Level an Doppelfoci ein Hinweis darauf sein, dass die Generierung der paarigen γ H2AX-Foci auf einen HR-unabhängigen Mechanismus zurückzuführen ist.

Um dies genauer zu untersuchen, wurden in weiteren Untersuchungen mit HeLa-Zellen unterschiedliche Teilschritte der HR inhibiert. Sofern die Entstehung der Doppelfoci auf einen HR-abhängigen Prozess zurückzuführen ist, würde durch die Inhibierung früher Teilschritte der HR ein geringeres Doppelfocilevel erwartet werden, da es hierbei zu keiner Stranginvasion käme. Dagegen würde durch die Unterbindung späterer Zwischenschritte nach einer möglichen Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals im Zuge der Stranginvasion die weitere Prozessierung und Auflösung der HR-Intermediate blockiert werden und somit ein erhöhtes Doppelfocilevel über einen längeren Zeitraum erhalten bleiben. Jedoch wiesen HeLa wt-Zellen im Vergleich zu den mit dem Rad51-Inhibitor B02 behandelten Zellen, bei denen mit der Inhibierung der Rad51-abhängigen Homologiesuche und Stranginvasion frühe Schritte der HR blockiert sind, keine erhöhte Anzahl an paarigen γ H2AX-Foci in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen auf (Abbildung 26). Im Vergleich zu den zuvor eingesetzten HR-Mutanten des CHO-Systems spiegelte sich die durch den Rad51-Inhibitor B02 induzierte HR-Defizienz in einem Anstieg der γ H2AX-Focizahlen zu späten Zeiten nach Bestrahlung wider, während bei den CHO HR-Mutanten die γ H2AX-Focilevel im Gegensatz zum wt zu späten Zeiten nach Bestrahlung stagnierten. Der späte Anstieg der Focizahlen könnte auf zelluläre Instabilitäten zurückzuführen sein, die durch den Inhibitor B02 hervorgerufen werden. Diese Annahme wird durch weitere, in dieser Arbeit nicht beschriebene Untersuchungen bekräftigt, die in B02 behandelten HeLa-Zellen hohe Bruchlevel sowie eine Arretierung der Zellen in der Metaphase nach Bestrahlung in der G2-Phase zeigten. Darüber hinaus sind die Beobachtungen mit den Ergebnissen früherer Arbeiten konsistent, die in DT40-Zellen ebenfalls eine Ansammlung von Rad51-defizienten Zellen in der G2/M-Phase mit hohen Chromatidbruchzahlen, welche aus der Degradierung der Chromosomen im Zuge der einsetzenden Apoptose resultieren, nachgewiesen haben (Sonoda 1998). Ungeachtet dessen waren bei den B02 behandelten Zellen die Homologiesuche und Stranginvasion unterbunden und zu frühen Zeiten nach der Inkubation mit B02 keine chromosomeninstabilitätsbedingte, erhöhte DSB-Level feststellbar. Deshalb konnten die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten der B02 behandelten Metaphasezellen in Bezug auf die hier relevante Fragestellung verwendet werden.

Auch durch die Herunterregulierung von Rad54 und Mus81 in HeLa-Zellen, durch die das für den Beginn der DNA-Synthese erforderliche Entfernen der Rad51-Proteine vom invadierten Strang bzw. die Auflösung der intermediären Reparaturstrukturen blockiert und somit die HR zu späten Reaktionsschritten unterbunden ist, konnten gegenüber den wt-Zellen keine erhöhten Doppelfocilevel in G2-bestrahlten Metaphase-Chromosomen erzielt werden (Abbildung 27). Damit deuten die Ergebnisse der beiden Experimente auf eine HR-

unabhängige Generierung der paarigen γ H2AX-Foci hin. Weiter bestätigt wurde diese Annahme durch die Beobachtung, dass G2-Phasezellen schon zu frühen Zeiten nach Bestrahlung, zu denen noch keine Stranginvasion erfolgt, γ H2AX-Doppelfoci aufwiesen und zudem ihre Anzahl zu diesem Zeitpunkt deutlich höher war, als zu späteren Zeiten nach der Stranginvasion (Abbildung 28).

Somit widerlegen die gewonnenen Ergebnisse die zwischenzeitliche Hypothese der HR-abhängigen Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals, welche sich aus den anfänglichen Beobachtungen der DSB-Analysen entwickelte und deuten stattdessen auf eine HR-unabhängige Generierung der paarigen γ H2AX-Foci hin. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Erkenntnissen einer Veröffentlichung, die während der Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente erschien. Darin wurde postuliert, dass in Hefezellen bedingt durch die Rad51-vermittelte Homologiesuche eine Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals von der Bruchregion des geschädigten Stranges auf den intakten Donorstrang stattfindet (Renkawitz et al. 2013). Möglicherweise könnten die widersprüchlichen Ergebnisse der zwei Studien auf die Differenzen der beiden verschiedenen Zellsysteme bei der DSB-Schadensantwort sowie auf die Unterschiede der jeweils angewandten Methoden zurückzuführen sein. Während in Säugerzellen die Histonvariante H2AX nur einen Anteil von etwa 2 - 25 % der H2A-Histone ausmacht, weisen Hefezellen einen deutlich höheren Anteil an H2AX-Histonen auf (Downs et al. 2000; Rogakou et al. 1998). Im Gegensatz zu den Hefezellen können zudem bei den Säugerzellen die H2AX-Histone unregelmäßig auf den Chromosomen verteilt sein. Desweiteren verfügen höhere Eukaryonten über deutlich mehr mit H2AX/ γ H2AX wechselwirkende Proteine als Hefezellen (Savic et al. 2009), was möglicherweise die Phosphorylierung der H2AX-Histone beeinträchtigen könnte. Aus diesen Differenzen könnte bei den beiden Modellorganismen eine unterschiedliche Sensitivität in Bezug auf die Phosphorylierung von H2AX resultieren. Demnach wäre es vorstellbar, dass bei Hefezellen im Zuge der Stranginvasion leichter und häufiger eine H2AX-Phosphorylierungsreaktion auf dem invadierten Strang erfolgen könnte, während in höheren Eukaryonten ein Strangaustausch in einer mit H2AX unterbesetzten Chromatinregion zu keiner bzw. nur limitierten Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals führen würde.

Darüber hinaus erschweren zusätzlich die beiden angewandten, unterschiedlichen Methoden den Vergleich der Ergebnisse der zwei Studien. Während die immunfluoreszenzmikroskopische Foci-Analyse vergleichsweise hohe Konzentrationen der nachzuweisenden Proteine benötigt, sind im Zuge der von Renkawitz et al. verwendeten, sensitiveren Methode der γ H2AX-ChIP-Analyse erheblich kleinere Proteinmengen ausreichend, um H2AX-

Phosphorylierungsereignisse detektieren zu können (Renkawitz et al. 2013). Dies ermöglicht den Nachweis von phosphoryliertem H2AX auf DNA-Sequenzebene nach einer gezielten Induktion eines einzelnen DSB an einer spezifischen Stelle im Genom. Dadurch könnten bei der ChIP-Analyse einzelne bzw. sehr schwache Phosphorylierungsereignisse auf dem intakten Schwesterchromatid nach der Stranginvasion detektiert worden sein, bei denen es sich nicht um vollständig ausgebildeten γ H2AX-Foci im klassischen Sinne handelt. Diese schwachen Phosphorylierungsereignisse wären mit Hilfe der immunfluoreszenzmikroskopischen Foci-Analyse nicht nachweisbar. Allerdings wird die Theorie der HR-unabhängigen Doppelfocientstehung durch die Tatsache gestärkt, dass das Rad51-Focilevel bei HeLa-Zellen nach der Bestrahlung langsam ansteigt und erst 2 - 3 h nach der Schadensinduktion sein Maximum erreicht (Beucher et al. 2009). Folglich lässt sich daraus schließen, dass auch zu diesen Zeiten die Aktivität von Rad51 und damit die Effektivität der Homologiesuche und Stranginvasion am höchsten ist. Dagegen ist zu deutlich früheren Zeiten (1 h nach Bestrahlung), wenn überhaupt, nur eine minimale Anzahl an funktionsfähigen Rad51-Nukleoproteinfilamenten bereits ausgebildet, was gegen zu diesem Zeitpunkt stattfindende Stranginvasionsereignisse spricht.

Für zukünftige Studien bietet die γ H2AX-ChIP-Analyse potentiell eine vielversprechende Möglichkeit, die molekularen Mechanismen der H2AX-Phosphorylierung nach Schadensinduktion auch in humanen Zellen auf DNA-Sequenzebene erforschen zu können und sollte daher in naher Zukunft genauer verfolgt werden.

Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen könnte die Generierung der paarigen γ H2AX-Foci auf den folgenden HR-unabhängigen Mechanismus zurückzuführen sein: In der Interphase liegt die DNA unkondensiert im Karyoplasma als dynamische Struktur vor, aber auch mit einsetzender Kondensation bis zur Bindung der Spindelfaser an die Kinetochore der Chromosomen können sich die Chromosomen noch relativ frei im Zellkern bewegen. Diese Mobilität der Chromosomen wird nach einer DSB-Schadensinduktion erhöht (Dion et al. 2012; Miné-Hattab und Rothstein 2012; Neumann et al. 2012), wodurch die DSB-Region in Kontakt mit anderen in unmittelbarer, räumlichen Nähe liegenden Chromatin-Abschnitten kommen könnte und dadurch unabhängig vom Prozess der Stranginvasion eine Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals erfolgen könnte. Dabei würden die H2AX-Histone der zum Bruch benachbarten, intakten DNA-Abschnitte in den Aktionsradius der vor und hinter dem DSB lokalisierten ATM-Kinasen geraten und ebenfalls phosphoryliert werden. Während in der Interphase das H2AX-Phosphorylierungssignal auf nahezu jeden Bereich aller Chromosomen übertragen werden

kann, erhöht sich mit steigendem Kondensationsgrad der Chromosomen die Wahrscheinlichkeit, dass eine Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals auf einen Abschnitt des Schwesterchromatids in gleicher Höhe zum DSB erfolgt, was anschließend in den Chromosomenspreitungen als γ H2AX-Doppelfocus erscheint. Eine ähnliche Hypothese wurde bereits in einer früheren Arbeit diskutiert (Gehlen et al. 2011) und würde sich mit dem hier beschriebenen Modell decken.

Für eine endgültige Klärung, welcher genaue Mechanismus der Generierung von γ H2AX-Doppelfoci zugrunde liegt, oder ob die Entstehung der Doppelfoci möglicherweise doch allein auf die Schadensinduktion zurückzuführen ist, bedarf es weiterer Untersuchungen. Diese waren jedoch nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit und bieten somit einen interessanten Ansatzpunkt für nachfolgende Studien.

5.5 Auflösung von strahleninduzierten HR-Intermediaten

Nachdem im ersten Teil der Arbeit die Existenz von strahleninduzierten HR-Intermediaten in der Mitose nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, wie diese Chromatin-*Entanglements* im weiteren Verlauf des Zellzyklus prozessiert werden. Die Prozessierung dieser intermediären Reparaturstrukturen sollte besonders unter dem Aspekt näher untersucht werden, dass die weitere Reparatur über den Mechanismus der HR aufgrund der generellen Inhibierung der DSB-Reparatur in der Mitose unterbunden ist (Orthwein et al. 2014; Lee et al. 2014) sowie im Hinblick auf die bevorstehende Chromatidentrennung während der Anaphase. Unaufgelöste Chromatin-Verwickelungen, wie HR-induzierte D-Loops und Holliday Junctions, könnten bei der Chromatidentrennung zu Problemen führen, da das Überkreuzen der beiden Schwesterchromatiden den ordnungsgemäßen Transport der beiden Chromatiden zu den entgegengesetzten Zellpolen behindert. Dabei könnten zum Einen die Chromatin-*Entanglements* durch die mechanischen Zugkräfte des Spindelfaserapparates auseinandergerissen werden, wodurch es zur Generierung neuer, möglicherweise komplexer Brüche kommen würde. Zum Anderen könnte ein Zerreißen der Überkreuzungsstrukturen unterbleiben. Dadurch könnten die beiden Schwesterchromatiden weiterhin zusammenhängen und gemeinsam zu einem Zellpol gezogen werden, oder in der Äquatorialebene zurückbleiben und durch die Bildung der Kernhülle zufällig auf die Tochterzellen verteilt werden. Dadurch würde es zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Chromatiden auf die beiden Tochterzellen (Aneuploidie) kommen. Beide Szenarien hätten schwerwiegende Folgen für die Zelle und stellen eine Gefährdung ihrer genomischen Integrität dar, welche unter Umständen zu schweren Krankheiten oder sogar zum Zelltod führen könnten.

Wie bereits in Kapitel 5.3 beschrieben, konnte der anfängliche Verdacht, dass es im Zuge der Chromatidentrennung in der Anaphase zu einem Auseinanderreißen der intermediären Reparaturstrukturen und dadurch zur Entstehung neuer DSBs kommt, nicht erhärtet werden. Stattdessen lassen die Ergebnisse schlussfolgern, dass der Anstieg des γ H2AX-Focilevels von der Meta- zur Anaphase möglicherweise auf eine Übertragung des H2AX-Phosphorylierungssignals zurückzuführen ist und dass die HR-Intermediate vor der Chromatidentrennung in der Anaphase rechtzeitig aufgelöst werden.

Aufgrund aktueller Hinweise aus der Literatur, die in humanen Zellen eine Beteiligung der Helikase BLM und der Nuklease Mus81-Eme1 (Mus81) an der Auflösung von Replikationsstreß-bedingten Chromatin-*Entanglements* postulieren (Mimitou und Symington 2009; Wu und Hickson 2003; Ip et al. 2008) sollte im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden, ob möglicherweise auch die strahleninduzierten HR-Intermediate der G2-Phase nach dem Eintreten in die Mitose vor der Chromatidentrennung über einen BLM- bzw. Mus81-abhängigen Prozess aufgelöst werden.

5.6 Der Einfluss von BLM und Mus81 auf die DSB-Reparaturkapazität

Die Helikase BLM spielt nicht nur bei der Auflösung von Chromatin-*Entanglements* eine entscheidende Rolle, sondern auch bei der Resektion von DSB-Enden und damit bei der DSB-Reparatur (Abbildung 9). Aus diesem Grund wurde anhand von γ H2AX-Foci- und Chromatidbruchanalysen zunächst untersucht, welchen Einfluss eine BLM-Herunterregulierung auf die Reparaturkapazität einer in der G2-Phase bestrahlten Zelle hat, um eine möglicherweise darauf zurückzuführende Verfälschung der Ergebnisse der nachfolgenden SCE-Analysen (Abbildung 31) ausschließen zu können. Ebenso wurde auch der Einfluss von Mus81 auf die Reparaturkapazität der Zelle untersucht.

Obwohl BLM zusammen mit der Exonuklease Exo1 an der Resektion der Bruchenden und damit an einem entscheidenden, initialen Schritt der DSB-Reparatur über den Prozess der HR beteiligt ist (Truong et al. 2013; Zhu et al. 2008), konnte sowohl auf γ H2AX-Fociebene (Abbildung 29) als auch auf chromosomaler Bruchebene (Abbildung 30) keine Beeinträchtigung der DSB-Reparaturkapazität durch die Herunterregulierung von BLM in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Auch die Herunterregulierung von Mus81 zeigte keinerlei Auswirkungen auf die Reparaturkapazität der Zelle. Andere Arbeitsgruppen konnten bei einer gemeinsamen Inhibierung von BLM und Exo1 neben einem reduzierten RPA-Focilevel ein erhöhtes γ H2AX-Focilevel und damit einen Einfluss auf die DSB-Reparatur nach Bestrahlung nachweisen (Shibata et al. 2014). Dennoch widersprechen sich die unterschiedlichen

Beobachtungen nicht, sondern sind konsistent mit den Forschungsergebnissen von Nimonkar et al. (Nimonkar et al. 2008). In dieser Arbeit konnte BLM eine stimulierende Wirkung auf Exo1 und daraus resultierend eine höhere Effektivität bei der Resektion zugeschrieben werden. Jedoch zeigten Nimonkar et al. ebenso, dass Exo1 auch ohne die Helikaseaktivität von BLM mit einer geringeren Effektivität die Bruchenden resektiert. Weitere Studien zeigen im Vergleich zu einer gleichzeitigen Inhibierung beider Faktoren, dass eine einfache Depletion von BLM oder Exo1 nur eine geringe Auswirkung auf das Resektionsverhalten der Zelle hat (Gravel et al. 2008) und stehen damit im Einklang mit den Beobachtungen der DSB-Analysen der vorliegenden Arbeit (Abbildung 29, Abbildung 30). Somit legt die Literatur zwar eine geringfügige Beeinflussung des Resektionsverhaltens der Zelle durch die Herunterregulierung von BLM nahe, welche jedoch aufgrund des generell geringen Anteils der HR von etwa 15 % an der Reparatur von strahleninduzierten DSBs (Beucher et al. 2009) keinen bzw. nur einen verschwindend geringen Effekt auf die Gesamt-Reparaturkapazität der Zelle ausübt. Dementsprechend führt das geringfügig beeinflusste Resektionsverhalten zu keinen sichtlichen Auswirkungen auf γ H2AX-Foci- und Chromatidbruchebene. Weiter wäre denkbar, dass durch die Verlangsamung der BLM- und Exo1-abhängigen Resektion, die für die Reparatur über den Prozess der HR essentiell ist, vermehrt DSBs über den Mechanismus des NHEJ repariert werden und somit ein möglicher siBLM-induzierter Reparaturdefekt kompensiert wird. Auch in Abwesenheit von BLM erfolgt zunächst eine CtIP-abhängige, initiale Resektion der Bruchenden (Frit et al. 2014; Grabarz et al. 2012). Trotz dieser initialen Resektion können die Brüche bei einer Verlangsamung oder eines Ausbleibens der weiterführenden, BLM/Exo1-abhängigen Resektion über das NHEJ repariert werden. Dadurch würde ein siBLM-induzierter Reparaturdefekt nicht zu einem auf γ H2AX-Gesamtfoebene sichtbaren Reparaturdefekt führen, sondern zu einer Verschiebung bei der Wahl des verwendeten Reparaturweges. Da DSBs über das NHEJ schneller repariert werden als über die HR, würde dabei bei den siBLM behandelten Zellen im Falle einer Kompensierung durch das NHEJ ein im Vergleich zu den Kontrollzellen geringeres Bruchlevel erwartet werden. Dies war jedoch weder bei den γ H2AX-Focianalysen (Abbildung 29), noch bei den Chromatidbruchstudien (Abbildung 30) zu beobachten. Somit scheint die Herunterregulierung von BLM die Reparatur über die HR so minimal zu beeinflussen, dass weder eine mögliche Kompensierung des Reparaturdefekts durch das NHEJ, noch ein nicht-kompensiertes, verlangsamtes Resektionsverhalten die DSB-Reparaturkapazität der Zelle auf γ H2AX-Foci- und Chromatidbruchebene nachweislich beeinflussen.

Zusammenfassend zeigte die Herunterregulierung von BLM sowie von Mus81 weder auf γ H2AX-Fociebene noch auf chromosomaler Bruchebene Auswirkungen auf das DSB-Level

nach Bestrahlung. Daher kann die DSB-Reparaturkapazität in BLM- und Mus81-defizienten Zellen in Bezug auf die im Rahmen der aktuellen Fragestellung durchgeführten SCE-Analysen (Abbildung 31), welche im nachfolgenden Abschnitt diskutiert werden (Kapitel 5.7), als unbeeinflusst gesehen werden.

5.7 Die Mus81-abhängige Auflösung von strahleninduzierten HR-Intermediaten in der Mitose

Aufgrund früherer Forschungsergebnisse, die eine Beteiligung von BLM und Mus81 an der Auflösung von Replikationsstress-bedingten Chromatin-*Entanglements* postulieren (Mimitou und Symington 2009; Wu und Hickson 2003; Ip et al. 2008), entwickelte sich die Annahme, dass die Auflösung von strahleninduzierten HR-Intermediaten ebenfalls über einen BLM- und Mus81-abhängigen Mechanismus erfolgen könnte. Dies wurde mit Hilfe von SCE-Analysen in BLM- und Mus81-defizienten HeLa-Zellen genauer untersucht, nachdem nachgewiesen werden konnte, dass die Herunterregulierung von BLM sowie von Mus81 keinen Einfluss auf die Reparaturkapazität der Zelle hat (Abbildung 29, Abbildung 30).

Im Rahmen der SCE-Analysen (Abbildung 31) wurde in HeLa-Zellen durch die Behandlung mit Calyculin A eine vorzeitige Chromosomenkondensation in G2-Phasezellen induziert sowie durch die Inkubation mit Colcemid eine Arretierung der Zellen in der Metaphase erreicht. Sowohl die Calyculin- als auch die Colcemid behandelten Zellen zeigten nach der Herunterregulierung von BLM unter allen Versuchsbedingungen deutlich erhöhte SCE-Level (Abbildung 31). Dies ist auf die Prozessierung von aus der S-Phase stammenden Replikationsintermediaten in der S- und G2-Phase zurückzuführen. Während dies in Anwesenheit von BLM über den Prozess der Dissolution erfolgt, bei dem es ausschließlich zur Ausbildung von *Non-crossover*-Strukturen kommt, wird die Auflösung der Chromatin-*Entanglements* nach der Herunterregulierung von BLM durch die Nukleasen Mus81 und Gen1 kompensiert (Gao 2003; Sarbajna et al. 2014; Pepe und West 2014a; Pepe und West 2014b). Der dabei stattfindende Mechanismus der Resolution führt zur Generierung von *Crossover*-Strukturen, woraus ein erhöhter SCE-Level resultiert. Da nach Colcemid-Behandlung der strahleninduzierte Anstieg des SCE-Levels bei den BLM-defizienten Zellen etwa dem Anstieg bei den Kontrollzelllinien entsprach, konnte eine BLM-vermittelte Auflösung der strahleninduzierten HR-Intermediate in der Mitose ausgeschlossen werden. Im Vergleich zu den Kontrollzelllinien Mock und siCtrl zeigten Mus81-defiziente Zellen nach Bestrahlung und Calyculin-Behandlung vergleichbare SCE-Level, während sie nach Colcemid-Behandlung nur einen minimalen strahleninduzierten SCE-Anstieg aufwiesen. Diese Beobachtungen belegen,

dass die Auflösung der strahleninduzierten HR-Intermediate in der Mitose über einen Mus81-abhängigen Prozess erfolgt und stehen im Einklang mit der bereits nachgewiesenen Beteiligung von Mus81 an der Auflösung von Replikationsstress-bedingten Chromatin-*Entanglements* in der Mitose (Bastin-Shanower et al. 2003; Matos et al. 2011; Naim et al. 2013). Desweiteren ist die Erkenntnis konsistent mit weiteren Forschungsarbeiten, die dem Mus81-Eme1-Komplex eine geringe Aktivität während der G1-, S- und G2-Phase zuschreiben, welche jedoch bedingt durch eine Hyperphosphorylierung ihrer Eme1-Untereinheit gegen Ende der G2-Phase bis zu ihrem Maximum in der Prometaphase rasch ansteigt (Matos et al. 2011; Dehé et al. 2013). Während der S-Phase interagiert die katalytische Untereinheit Mus81 stattdessen mit dem Cofaktor Eme2 (*essential meiotic structure-specific endonuclease subunit 2*), wodurch sich ihre Substratspezifität ändert und ihr eine Beteiligung an der Reaktivierung blockierter Replikationsgabeln zukommt (Pepe und West 2014a; Pepe und West 2014b). Darüber hinaus lässt ebenfalls die Tatsache, dass der strahleninduzierte Anstieg der SCE-Level bei den Colcemid behandelten Kontrollzelllinien Mock und siCtrl sowie nach der Herunterregulierung von BLM größer war als bei den entsprechenden Calyculin behandelten Zellen, darauf schließen, dass der Großteil der strahleninduzierten HR-Intermediate nicht in der G2-Phase über einen BLM-abhängigen Prozess, sondern in der darauffolgenden Mitose aufgelöst wird (Abbildung 31). Dieser Unterschied fiel jedoch aufgrund der unerwartet niedrigen SCE-Level der unbestrahlten, Calyculin behandelten Zellen, welche etwa auf der Höhe der unbestrahlten, Colcemid behandelten Zellen erwartet wurden, sehr klein aus und könnte auf methodenbedingte Qualitätsunterschiede bei den SCE-Färbungen zwischen Colcemid und Calyculin behandelten Zellen zurückzuführen sein. Während bei den SCE-Färbungen der Colcemid behandelten Zellen starke Kontraste zwischen den Farbübergängen erreicht werden konnten, waren diese nach Calyculin-Behandlung weniger klar zu erkennen und erschienen unscharf bzw. verschwommen. Dies könnte zur Folge haben, dass bei der anschließenden Auswertung nicht alle SCEs erkannt wurden und somit das tatsächliche SCE-Level unterschätzt wurde. Analog hierzu trat dieser Umstand auch bei den bestrahlten, mit Calyculin behandelten Zellen auf. Da jedoch bei den Spreitungen der Calyculin behandelten Proben, bei denen eine vorzeitige Chromosomenkondensation in der G2-Phase induziert wurde, methodenbedingt ein Auftreten von natürlichen Metaphase-spreitungen nicht verhindert werden konnte, könnten bei den SCE-Analysen in Calyculin behandelten Proben versehentlich auch Metaphasezellen ausgewertet worden sein. Aufgrund der Aktivität von Mus81 in der Mitose, könnten diese Zellen höhere SCE-Level aufweisen als G2-Phasezellen und maßgeblich das SCE-Level der Calyculin behandelten Zellen nach

Bestrahlung nach oben verfälschen. Dagegen wäre ihr Einfluss auf das SCE-Level der unbestrahlten Calyculin-Proben aufgrund des ebenfalls niedrigen SCE-Levels bei unbestrahlten, natürlichen Metaphasen gering.

Ungeachtet dessen belegen die SCE-Analysen, dass die Auflösung der strahleninduzierten HR-Intermediate in der Mitose über einen Mus81-abhängigen Prozess erfolgt. Desweiteren lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die Auflösung der strahleninduzierten HR-Intermediate von G2-Phasezellen hauptsächlich in der Mitose stattfindet. Die Tatsache, dass sowohl an der Auflösung der strahleninduzierten als auch der Replikationsstress-bedingten Chromatin-*Entanglements* die selben Nukleasen und Helikasen beteiligt sind, legt nahe, dass bei der Prozessierung von Chromatin-*Entanglements* nicht bzgl. ihrer Generierungsursachen differenziert wird und folglich deren Auflösung über die selben Mechanismen erfolgt.

Es bleibt zu diskutieren, warum die Auflösung der strahleninduzierten HR-Intermediate hauptsächlich in der Mitose erfolgt. In der aktuellen Literatur wird der in der S- und G2-Phase aktive, BLM/TopoIII α -Komplex-abhängige Mechanismus der Dissolution als der bevorzugte Prozess zur Auflösung von Chromatin-*Entanglements* beschrieben (Wu und Hickson 2003; Wyatt et al. 2013). Da bei dem Prozess der Dissolution keine *Crossover*-Strukturen sondern ausschließlich *Non-crossover*-Strukturen generiert werden, bewahrt er die Zelle vor einem möglichen Verlust der Heterozygotie. Allerdings zeigten die vergleichbar starken, strahleninduzierten Anstiege der SCE-Level der BLM-defizienten Zellen und der Kontrollzelllinien nach Colcemid-Behandlung, dass BLM zu frühen Zeiten der Mitose nicht an der Auflösung der strahleninduzierten HR-Intermediate beteiligt ist (Abbildung 31). Damit sind die Beobachtungen der SCE-Analysen dieser Arbeit konsistent mit den Ergebnissen früherer Studien, die eine starke Aktivität BLMs als BLM/TopoIII α -Komplex während der S- und G2-Phase zeigen, welche jedoch zu Beginn der Mitose rasch abnimmt (Dutertre et al. 2000; Matos et al. 2011). Dagegen fungiert der Nuklease-vermittelte Mechanismus der Resolution vermutlich als eine Art Absicherung, da er zur Generierung der Heterozygotie-gefährdenden *Crossover*-Strukturen führt und möglicherweise deshalb erst während des G2/M-Übergangs und damit nach BLM aktiviert wird. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen unkontrollierbaren, passiven Prozess, der auf die Insensitivität des G2/M-Checkpoints zurückzuführen ist. Durch die Bestrahlung in der G2-Phase und die vorzeitige Aufhebung des G2/M-Checkpoints könnte eine erhöhte Anzahl an intermediären Reparaturstrukturen der HR (z.B. D-Loops, einfache HJs) in die Mitose gelangen. Diese Strukturen befänden sich zum Zeitpunkt des Mitoseeintritts im Rahmen der HR mitten in der

Prozessierung, weshalb sie auch in der G2-Phase noch kein Substrat für eine BLM-abhängige Auflösung dargestellt hätten. In der darauffolgenden Mitose ist der BLM-vermittelte Prozess der Dissolution jedoch inaktiv, weshalb die Auflösung der HR-Intermediate nur noch über die Nuklease-abhängige Resolution erfolgen kann, was folglich zu einem Anstieg des SCE-Levels führt.

Trotz des vorherrschenden Prozesses der BLM-abhängigen Dissolution und der sehr geringen Aktivität des Mus81-Eme1-Komplexes während der G2-Phase, zeigten die Calyculin behandelten Zellen unabhängig ihrer siRNA-Behandlung zwar einen niedrigeren strahleninduzierten Anstieg des SCE-Levels als in der Mitose, aber einen dennoch nicht zu vernachlässigen Anstieg. Da bei zwei der insgesamt vier Experimenten die DNA mittels Giemsa angefärbt wurde, war bei diesen Versuchen methodenbedingt ein Ausschluss von in der S-Phase bestrahlten und mit Calyculin behandelten Zellen nicht möglich, weshalb die während der S-Phase bei der Auflösung von blockierten Replikationsgabeln durch die Nukleasen Mus81 (Mus81-Eme2) und Gen1 entstandenen *Crossover*-Strukturen die tatsächlichen SCE-Level der G2-Phase nach oben verfälschen könnten (Gao 2003; Sarbajna et al. 2014). Desweiteren könnten, wie bereits zuvor erwähnt, die experimentell nicht auszuschließenden, natürlichen Metaphasen die SCE-Level der Calyculin behandelten Proben bei der Auswertung nach oben verfälschen.

Anhand der SCE-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Auflösung der strahleninduzierten HR-Intermediate der G2-Phase hauptsächlich in der darauffolgenden Mitose und über einen Mus81-abhängigen Prozess erfolgt. Ausgehend von dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob die Herunterregulierung von Mus81 und BLM in Bezug auf die Auflösung von Chromatin-*Entanglements* eine Auswirkung auf das DSB-Level in der folgenden G1-Phase hat. Aber auch die Frage, welche Folgen die Bestrahlung in der G2-Phase generell auf das Bruchlevel in der G1-Phase hat, sollte geklärt werden. Mit Hilfe von γ H2AX-Focianalysen in G2-bestrahlten G1-Phasezellen wurden diese beiden Fragestellungen näher untersucht.

Interessanterweise zeigten dabei BLM- sowie Mus81-defiziente, humane G1-Phasezellen nach Bestrahlung in der G2-Phase mit etwa 1 - 2 γ H2AX-Foci/Zelle sehr geringe Focilevel, welche nur geringfügig über denen der Kontrollzellen lagen (Abbildung 32). Dies deutet darauf hin, dass die Resolution von HR-Intermediaten in der Mitose nicht nur über den Mus81-vermittelten Prozess erfolgt. Vielmehr lässt sich daraus schließen, dass neben Mus81 noch weitere Nukleasen und/oder Helikasen an der Auflösung der strahleninduzierten HR-Intermediate in der Mitose beteiligt sind. Andernfalls würden die Chromatin-*Entanglements* in

Abwesenheit von Mus81 nicht rechtzeitig aufgelöst werden und während der Chromatidentrennung durch die mechanischen Zugkräfte der Spindelfaser auseinandergerissen werden. Dies hätte eine Generierung von vermutlich komplexen und schwer reparierbaren DSBs zur Folge, welche wiederum zu einem deutlich erhöhten γ H2AX-Focilevel in der darauffolgenden G1-Phase führen würde. Ein solch erhöhtes Bruchlevel war allerdings in den γ H2AX-Focianalysen in G2-bestrahlten G1-Phasezellen nicht zu beobachten (Abbildung 32).

Da die Herunterregulierung von Mus81 in der Metaphase zu einem erniedrigten SCE-Level führte (Abbildung 31) und eine Prozessierung der HR-Intermediate über die BLM-abhängig Dissolution während der Mitose nicht erfolgt, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass in der Metaphase noch nicht alle HR-Intermediate aufgelöst sind. Ihre Prozessierung könnte zu einem späteren Zeitpunkt, im Laufe der vorangeschrittenen Metaphase bis kurz vor der Chromatidentrennung während der Anaphase über alternative Auflösungsmechanismen erfolgen. In der Literatur sind beispielsweise HJs als bevorzugte Substrate der Endonuklease Gen1 beschrieben (Ip et al. 2008; Rass et al. 2010). Da die Aktivität von Gen1 in humanen Zellen allein über den Import/Export des Proteins in den Zellkern reguliert wird (Chan und West 2014a, 2014b) und die Konzentration der Nuklease im Zellkern durch den einsetzenden Zerfall der Kernmembran während der Prometaphase langsam ansteigt, erreicht Gen1 seine maximale Konzentration im Zellkern erst nach der Prometaphase, während Mus81 bereits zur Prometaphase sein Aktivitätsmaximum erlangt (Matos et al. 2011). Somit deuten die Ergebnisse mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf hin, dass strahleninduzierte HR-Intermediate, die in der Mitose nicht von Mus81 aufgelöst wurden, zu einem späteren Zeitpunkt, jedoch vor der Chromatidentrennung, durch Gen1 aufgelöst werden.

Mit Slx1-Slx4 (Slx1) könnte darüber hinaus eine weitere Nuklease an der Prozessierung von strahleninduzierten HR-Intermediaten in der Mitose beteiligt sein. Slx1 wird jedoch bereits zum Zeitpunkt des G2/M-Übergangs aktiviert (Fricke 2003; Wyatt et al. 2013). Weitere Studien bezeugen, dass die Slx4-Untereinheit als eine Art Plattform fungiert, welche nicht nur mit der katalytischen Untereinheit Slx1, sondern auch mit den katalytischen Untereinheiten Mus81 des Mus81-Eme1-Komplexes sowie XPF der ERCC1-XPF Endonuklease interagiert (Fekairi et al. 2009). Jüngere Forschungsergebnisse konnten darüber hinaus die Ausbildung eines Holoenzym aus Mus81-Eme1- und Slx1-Slx4-Untereinheiten sowie dessen Bindung an HJs nachweisen und dadurch eine koordinierte, enge Zusammenarbeit der beiden Nukleasen Mus81 und Slx1 mit einer gesteigerten Effektivität bei der Resolution von HR-Intermediaten postulieren (Wyatt et al. 2013). Dies erklärt zugleich, dass die Herunterregulierung von Mus81 und der damit verbundene Funktionsverlust nur geringfügig durch Slx1 alleine

kompensiert werden kann und dementsprechend Colcemid behandelte Zellen nach Bestrahlung ein geringeres SCE-Level als die Kontrollzelllinien aufwiesen (Abbildung 31). Auch die in Säugern noch weniger gut erforschte Endonuklease ERCC1-XPF (XPF) könnte an der Auflösung von strahleninduzierten HR-Intermediaten in der Mitose beteiligt sein. Während frühere Veröffentlichungen D-Loops und *nicked* HJs als potentielle Substrate von XPF klassifizieren (Osman et al. 2003; Niedernhofer et al. 2001), legen jüngere Arbeiten in humanen Zellen XPF und Mus81 überschneidende Funktionen bei der Resolution von HR-bedingten Chromatin-Entanglements sowie eine gegenseitige Kompensation nach Funktionsverlust der jeweils anderen Nuklease nahe (Kikuchi et al. 2013). Wie Mus81, gehört auch XPF zu den Proteinen der XPF/Mus81-Familie und ist während der S-Phase und des G2/M-Übergangs aktiv. Aufgrund seiner essentiellen Beteiligung an der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) ist XPF darüber hinaus auch während der G1-Phase translational hochreguliert (Mjelle et al. 2015). Zudem lässt die Tatsache, dass Slx4 neben Mus81 und Slx1 auch mit XPF interagiert (Fekairi et al. 2009), vermuten, dass auch XPF an einer engen, koordinierten Zusammenarbeit mit den beiden Nukleasen Mus81 und Slx1 beteiligt ist, um die Resolution von strahleninduzierten HR-Intermediaten in der Mitose zu katalysieren. Die in der Literatur beschriebene, kompensierende Wirkung von XPF konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit in Mus81-defizienten Metaphase-Zellen nach Bestrahlung nicht beobachtet werden (Abbildung 31). Vielmehr deuten die SCE-Analysen weder auf eine vollständige Kompensation, noch auf eine vollständige Unterbindung der Resolution von HR-Intermediaten in der Mitose nach der Inhibierung von Mus81 hin. Allerdings lässt sich anhand dieses Versuchsaufbaus keine genaue Aussage darüber treffen, welchen Anteil XPF an der Prozessierung der HR-Intermediate hat und ob der leichte, strahleninduzierte Anstieg des SCE-Levels bei den Colcemid behandelten Zellen auf die Funktion der bereits zum G2/M-Übergang aktivierten Nukleasen XPF und Slx1 oder auf die ab der Prometaphase steigende Aktivität von Gen1 zurückzuführen ist. Hierfür bedarf es zusätzliche Untersuchungen mit Zellen, bei denen neben Mus81 noch weitere Nukleasen inhibiert sind. Diese Analysen waren jedoch nicht mehr Bestandteil dieser Arbeit und bieten somit einen interessanten Forschungsansatz für zukünftige Arbeiten.

Der durch die Nukleasen Mus81, Slx1, XPF und Gen1 katalysierte Mechanismus der Resolution führt neben der Ausbildung von *Non-Crossover*-Strukturen auch zur Generierung von *Crossover*-Produkten. Sofern bei der HR das homologe Chromosom anstatt des Schwesterchromatids als Donor für die zu synthetisierende Sequenz dient, könnte dies zu einem Verlust der Heterozygotie führen, was vor allem im Hinblick auf die Zellteilung

unerwünscht ist. Aus diesem Grund könnten die Nuklease-abhängigen Auflösungsprozesse erst zum Zeitpunkt des G2/M-Übergangs aktiviert werden und somit nach dem in der G2-Phase aktiven BLM als eine Art Absicherung agieren, um die noch verbliebenen, von BLM nicht-prozessierten Chromatin-*Entanglements* aufzulösen. Verglichen mit den unkalkulierbaren, schweren Schädigungen, die aus der Existenz von unaufgelösten Chromatin-*Entanglements* während der Chromatidentrennung resultieren, stellt der Verlust der Heterozygotie ein ertragbares Risiko dar, welches die genomische Integrität der Zelle weniger stark gefährdet. Im Falle eines Funktionsverlustes von BLM könnte somit die Nuklease-vermittelte Resolution den Ausfall BLM kompensieren, was sich in einem deutlich erhöhten SCE-Level in BLM-defizienten Zellen widerspiegelte (Abbildung 31).

Trotz der einsetzenden Hyperphosphorylierung während der Mitose und der damit verbundenen Markierung von BLM für die in der G1-Phase beginnende Degradierung (Dutertre et al. 2000) konnte gezeigt werden, dass BLM zusammen mit der Helikase PICH (*Plk1-interacting checkpoint helicase*) zu späteren Zeiten der Mitose (Anaphase) an sogenannte ultrafeine Anaphasebrücken bindet und an der Auflösung dieser verwickelten Chromatinstrukturen zwischen zwei Schwesterchromatiden beteiligt ist (Chan et al. 2007). Ein Auftreten dieser Anaphasebrücken ist u.a. auch auf HR-Intermediate zurückzuführen (Acilan et al. 2007), die zuvor weder vom BLM/TopoIII α -Komplex während der S- und G2-Phase, noch von den Nukleasen Mus81, Gen1, Slx1 oder XPF während der frühen Mitose aufgelöst wurden. Somit könnte BLM zusammen mit PICH in einem weiteren Mechanismus als eine Art letzte Kontrollinstanz nach den Nukleasen agieren, um die Zelle vor schwerwiegenden Schädigungen durch nicht-aufgelöste Chromatin-*Entanglements* in der Anaphase zu bewahren.

Obwohl humane Zellen nach Bestrahlung in der G2-Phase mit etwa 10 - 20 DSBs in die Mitose eintreten (Deckbar et al. 2007; Abbildung 25 - Abbildung 28) und die DSB-Reparatur während der Mitose inhibiert ist (Orthwein et al. 2014; Lee et al. 2014), zeigten sie unabhängig ihrer siRNA-Behandlung in der darauffolgenden G1-Phase ein sehr niedriges Bruchlevel (Abbildung 32). Dies läßt auf eine schnelle Reparatur der DSBs unmittelbar nach dem Erreichen der G1-Phase über den Prozess des NHEJ schließen. Desweiteren deutet das Ergebnis darauf hin, dass sich die Zellen zu den im Experiment gewählten Fixierungszeitpunkten (13 und 16 h nach Bestrahlung in der G2-Phase) bereits für eine ausreichend lange Zeit in der G1-Phase befanden, um die hohen DSB-Level der Mitose auf das in der G1-Phase detektierte, niedrige γ H2AX-Focilevel repariert zu haben.

Die Beobachtungen, dass die in der G2-Phase durch Strahlung induzierten und in die Mitose gewanderten DSBs erst in der darauffolgenden G1-Phase repariert werden, stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Giunta et al. (Giunta et al. 2010). Sie postulieren, dass zwar eine Markierung von in der Mitose induzierten DSBs durch H2AX-Phosphorylierung und damit die Initiation früher Schritte der DNA-Schadensantwort während der Mitose stattfindet, dass aber die tatsächliche Reparatur der Brüche erst in der nachfolgenden G1-Phase erfolgt. Untermuert wird diese Theorie durch die Beobachtung, dass auch die während der frühen Mitose erfolgende, Mus81-abhängige Auflösung von späten Replikationsintermediaten zu einer Induktion von DSBs führt, deren Reparatur erst in der darauffolgenden G1-Phase oder im Zuge des nächsten Replikationszyklus während der S-Phase erfolgt (Naim et al. 2013; Lukas et al. 2011a; Gelot et al. 2015; Ying et al. 2013). Das Auftreten dieser Chromatin-*Entanglements* ist auf die Replikation bestimmter DNA-Bereiche, den sog. *common fragile sites* (CFS) zurückzuführen, deren Replikation nicht nur schwierig ist sondern auch erst zu einem späten Zeitpunkt stattfindet.

Nach der Herunterregulierung von BLM und Mus81 zeigten G2-bestrahlte G1-Phasezellen im Vergleich zu den Kontrollzellen leicht erhöhte γ H2AX-Focizahlen (Abbildung 32). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass trotz weiterer Nuklease- und Helikase-abhängiger *Backup*-Mechanismen für die Auflösung von HR-Intermediaten in der Abwesenheit von BLM und Mus81 dennoch vereinzelt Chromatin-*Entanglements* nicht rechtzeitig zur Chromatidentrennung aufgelöst werden und schließlich auseinandergerissen werden. Dies könnte zur Generierung komplexer Bruchstrukturen führen, deren Reparatur auch nach einigen Stunden in der G1-Phase noch nicht vollständig abgeschlossen ist und sich in Form eines erhöhten γ H2AX-Focilevels widerspiegeln.

Zusammenfassend haben die SCE-Analysen gezeigt, dass die Auflösung der strahlen-induzierten HR-Intermediate der G2-Phase größtenteils in der darauffolgenden Mitose erfolgt und der dabei vorherrschende Prozess Mus81-abhängig ist. Die DSB-Reparaturuntersuchungen in der G1-Phase unterstützen weiter die Annahme, dass die Chromatin-*Entanglements*, die von Mus81 nicht prozessiert wurden, zu einem späteren Zeitpunkt vor der Chromatidentrennung durch weitere Nukleasen und/oder Helikasen aufgelöst werden. Somit leisten diese Nukleasen und/oder Helikasen einen weiteren Beitrag zur Sicherung der genomischen Integrität der Zelle. Welche Mechanismen dabei genau eine Rolle spielen und ob dabei möglicherweise ein koordiniertes Zusammenspiel zwischen den unterschiedlichen Prozessen erfolgt, ist aktuell noch nicht geklärt. Allerdings war die genauere Erforschung

dieser Zusammenhänge nicht mehr Bestandteil dieser Arbeit und bietet somit einen interessanten Ansatzpunkt für künftige Studien.

6 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse konnten einen Beitrag zu einem besseren Verständnis liefern, wie strahleninduzierte DSBs im Laufe des Zellzyklus prozessiert werden. So konnte gezeigt werden, dass der G2/M-Checkpoint vorzeitig vor Abschluss der DSB-Reparatur wieder aufgehoben wird und G2-Phasezellen mit HR-Intermediaten in die Mitose eintreten. Die Ergebnisse legten weiter nahe, dass einige HR-Faktoren einen Einfluss auf die Aktivierung des G2/M-Checkpoints haben. Die genauere Untersuchung dieser Zusammenhänge war jedoch nicht mehr Bestandteil dieser Arbeit. Somit bieten die Erforschung der Einflüsse von HR-relevanten Faktoren auf die Regulation des Zellzyklus und der Zellzykluskontrolle sowie die Identifizierung der potentiellen Wechselwirkungspartner der HR-Faktoren innerhalb der Checkpoint-Signalkaskade interessante Themen für zukünftige Studien.

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt nachfolgender Arbeiten könnte sich mit den genauen Gründen für die Existenz von paarigen γ H2AX-Foci nach Bestrahlung befassen. Die vorliegende Arbeit legte diesbezüglich aufgrund des Auftretens der γ H2AX-Doppelfoci sowohl bei wt-Zellen als auch bei HR-defizienten Zellen sowie zu frühen Zeiten nach Bestrahlung eine HR-unabhängige Generierung der γ H2AX-Doppelfoci nahe. So bleibt zu klären, ob die Existenz der paarigen γ H2AX-Foci allein auf die Schadensinduktion oder auf alternative Phosphorylierungsübertragungsprozesse zurückzuführen ist.

In dieser Arbeit konnte weiter gezeigt werden, dass die Auflösung strahleninduzierter HR-Intermediate bevorzugt in der darauffolgenden Mitose und über einen Mus81-abhängigen Prozess erfolgt. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Mus81 nur ein Faktor eines noch wenig erforschten, komplexen und effektiven Zusammenspiels vieler Proteine ist. Dieses enge Zusammenspiel stellt eine korrekte und rechtzeitige Auflösung von Chromatin-*Entanglements* in der G2/M-Phase sicher und schützt somit die genomische Integrität der Zelle. Die Erforschung dieser koordinierten Interaktionen, die Identifizierung der daran involvierten Faktoren sowie die genaue Aufklärung der dabei erfolgenden Prozesse stellen somit vielversprechende Ansatzpunkte für zukünftige Studien dar.

7 Literaturverzeichnis

- Acilan, Ceyda; Potter, Douglas M.; Saunders, William S. (2007): DNA repair pathways involved in anaphase bridge formation. In: *Genes, chromosomes & cancer* 46 (6), S. 522–531. DOI: 10.1002/gcc.20425.
- Agostinho, Ana; Meier, Bettina; Sonnevile, Remi; Jagut, Marlène; Woglar, Alexander; Blow, Julian et al. (2013): Combinatorial Regulation of Meiotic Holliday Junction Resolution in *C. elegans* by HIM-6 (BLM) Helicase, SLX-4, and the SLX-1, MUS-81 and XPF-1 Nucleases. In: *PLoS Genet* 9 (7), S. e1003591. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003591.
- Al-Minawi, A. Z.; Saleh-Gohari, N.; Helleday, T. (2007): The ERCC1/XPF endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells. In: *Nucleic Acids Research* 36 (1), S. 1–9. DOI: 10.1093/nar/gkm888.
- Andres, S. N.; Vergnes, A.; Ristic, D.; Wyman, C.; Modesti, M.; Junop, M. (2012): A human XRCC4-XLF complex bridges DNA. In: *Nucleic Acids Research* 40 (4), S. 1868–1878. DOI: 10.1093/nar/gks022.
- Asaithamby, A.; Hu, B.; Chen, D. J. (2011): Unrepaired clustered DNA lesions induce chromosome breakage in human cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (20), S. 8293–8298. DOI: 10.1073/pnas.1016045108.
- Assoian, R. (1997): Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. In: *Current Opinion in Cell Biology* 9 (1), S. 93–98. DOI: 10.1016/S0955-0674(97)80157-3.
- Bachrati, C. Z. (2006): Mobile D-loops are a preferred substrate for the Bloom's syndrome helicase. In: *Nucleic Acids Research* 34 (8), S. 2269–2279. DOI: 10.1093/nar/gkl258.
- Bakkenist, Christopher J.; Kastan, Michael B. (2003): DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. In: *Nature* 421 (6922), S. 499–506. DOI: 10.1038/nature01368.
- Balajee, A. S.; Oh, H. J.; Natarajan, A. T. (1994): Analysis of restriction enzyme-induced chromosome aberrations in the interstitial telomeric repeat sequences of CHO and CHE cells by FISH. In: *Mutation research* 307 (1), S. 307–313.
- Bao, Yunhe (2011): Chromatin response to DNA double-strand break damage. In: *Epigenomics* 3 (3), S. 307–321. DOI: 10.2217/epi.11.14.
- Bardwell, A. J.; Bardwell, L.; Tomkinson, A. E.; Friedberg, E. C. (1994): Specific cleavage of model recombination and repair intermediates by the yeast Rad1-Rad10 DNA endonuclease. In: *Science (New York, N.Y.)* 265 (5181), S. 2082–2085.
- Barton, Olivia; Naumann, Steffen C.; Diemer-Biehs, Ronja; Künzel, Julia; Steinlage, Monika; Conrad, Sandro et al. (2014): Polo-like kinase 3 regulates CtIP during DNA double-strand break repair in G1. In: *J Cell Biol* 206 (7), S. 877–894. DOI: 10.1083/jcb.201401146.
- Bastin-Shanower, S. A.; Fricke, W. M.; Mullen, J. R.; Brill, S. J. (2003): The Mechanism of Mus81-Mms4 Cleavage Site Selection Distinguishes It from the Homologous Endonuclease Rad1-Rad10. In: *Molecular and Cellular Biology* 23 (10), S. 3487–3496. DOI: 10.1128/MCB.23.10.3487-3496.2003.
- Baumann, P. (2001): Pot1, the Putative Telomere End-Binding Protein in Fission Yeast and Humans. In: *Science* 292 (5519), S. 1171–1175. DOI: 10.1126/science.1060036.
- Beucher, Andrea; Birraux, Julie; Tchouandong, Leopoldine; Barton, Olivia; Shibata, Atsushi; Conrad, Sandro et al. (2009): ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. In: *EMBO J* 28 (21), S. 3413–3427. DOI: 10.1038/emboj.2009.276.

- Boddy, Michael N.; Gaillard, Pierre-Henri L.; McDonald, W.Hayes; Shanahan, Paul; Yates, John R.; Russell, Paul (2001): Mus81-Eme1 Are Essential Components of a Holliday Junction Resolvase. In: *Cell* 107 (4), S. 537–548. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00536-0.
- Bowles, M.; Lally, J.; Fadden, A. J.; Mouilleron, S.; Hammonds, T.; McDonald, N. Q. (2012): Fluorescence-based incision assay for human XPF-ERCC1 activity identifies important elements of DNA junction recognition. In: *Nucleic Acids Research* 40 (13), S. e101-e101. DOI: 10.1093/nar/gks284.
- Bruno, Tiziana; Nicola, Francesca de; Iezzi, Simona; Lecis, Daniele; D'Angelo, Carmen; Di Padova, Monica et al. (2006): Che-1 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint. In: *Cancer Cell* 10 (6), S. 473–486. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.10.012.
- Bugreev, D. V.; Yu, X.; Egelman, E. H.; Mazin, A. V. (2007): Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. In: *Genes & Development* 21 (23), S. 3085–3094. DOI: 10.1101/gad.1609007.
- Burma, S. (2001): ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (45), S. 42462–42467. DOI: 10.1074/jbc.C100466200.
- Bussen, W.; Raynard, S.; Busygina, V.; Singh, A. K.; Sung, P. (2007): Holliday Junction Processing Activity of the BLM-Topo III -BLAP75 Complex. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (43), S. 31484–31492. DOI: 10.1074/jbc.M706116200.
- Ceballos, Shannon J.; Heyer, Wolf-Dietrich (2011): Functions of the Snf2/Swi2 family Rad54 motor protein in homologous recombination. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1809 (9), S. 509–523. DOI: 10.1016/j.bbagr.2011.06.006.
- Ceccaldi, Raphael; Rondinelli, Beatrice; D'Andrea, Alan D. (2016): Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. In: *Trends in Cell Biology* 26 (1), S. 52–64. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.07.009.
- Cesare, Anthony J.; Kaul, Zeenia; Cohen, Scott B.; Napier, Christine E.; Pickett, Hilda A.; Neumann, Axel A.; Reddel, Roger R. (2009): Spontaneous occurrence of telomeric DNA damage response in the absence of chromosome fusions. In: *Nat Struct Mol Biol* 16 (12), S. 1244–1251. DOI: 10.1038/nsmb.1725.
- Chan, Kok-Lung; North, Phillip S.; Hickson, Ian D. (2007): BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. In: *EMBO J* 26 (14), S. 3397–3409. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601777.
- Chan, Ying Wai; West, Stephen C. (2014a): Spatial control of the GEN1 Holliday junction resolvase ensures genome stability. In: *Nat Comms* 5, S. 4844. DOI: 10.1038/ncomms5844.
- Chan, Ying Wai; West, Stephen C. (2014b): Spatial control of the GEN1 Holliday junction resolvase ensures genome stability. In: *Nat Comms* 5, S. 4844. DOI: 10.1038/ncomms5844.
- Cornforth, M. N.; Bedford, J. S. (1993): Ionizing Radiation Damage and Its Early Development in Chromosomes. In: *Advances in Radiation Biology - DNA and Chromatin Damage Caused by Radiation*, Bd. 17: Elsevier (Advances in Radiation Biology), S. 423–496.
- Cornforth, M. N.; Goodwin, E. H. (1991): Transmission of radiation-induced acentric chromosomal fragments to micronuclei in normal human fibroblasts. In: *Radiation research* 126 (2), S. 210–217.
- Coulon, S. (2003): Slx1-Slx4 Are Subunits of a Structure-specific Endonuclease That Maintains Ribosomal DNA in Fission Yeast. In: *Molecular Biology of the Cell* 15 (1), S. 71–80. DOI: 10.1091/mbc.E03-08-0586.
- Crosio, Claudia; Fimia, Gian Maria; Loury, Romain; Kimura, Masashi; Okano, Yukio; Zhou, Hongyi et al. (2002): Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. In: *Molecular and Cellular Biology* 22 (3), S. 874–885.

-
- Dalal, S. N.; Schweitzer, C. M.; Gan, J.; DeCaprio, J. A. (1999): Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. In: *Molecular and Cellular Biology* 19 (6), S. 4465–4479.
- D'Amours, Damien; Jackson, Stephen P. (2002): The mre11 complex. At the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (5), S. 317–327. DOI: 10.1038/nrm805.
- Deckbar, Dorothee; Birraux, Julie; Krempler, Andrea; Tchouandong, Leopoldine; Beucher, Andrea; Walker, Sarah et al. (2007): Chromosome breakage after G2 checkpoint release. In: *J Cell Biol* 176 (6), S. 749–755. DOI: 10.1083/jcb.200612047.
- Deckbar, Dorothee; Jeggo, Penny A.; Löbrich, Markus (2011): Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. In: *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 46 (4), S. 271–283. DOI: 10.3109/10409238.2011.575764.
- Dehé, Pierre-Marie; Coulon, Stéphane; Scaglione, Sarah; Shanahan, Paul; Takedachi, Arato; Wohlschlegel, James A. et al. (2013): Regulation of Mus81–Eme1 Holliday junction resolvase in response to DNA damage. In: *Nat Struct Mol Biol* 20 (5), S. 598–603. DOI: 10.1038/nsmb.2550.
- Di d'Adda Fagagna, Fabrizio; Teo, Soo-Hwang; Jackson, Stephen P. (2004): Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. In: *Genes & Development* 18 (15), S. 1781–1799. DOI: 10.1101/gad.1214504.
- Dion, Vincent; Kalck, Véronique; Horigome, Chihiro; Towbin, Benjamin D.; Gasser, Susan M. (2012): Increased mobility of double-strand breaks requires Mec1, Rad9 and the homologous recombination machinery. In: *Nature cell biology* 14 (5), S. 502–509. DOI: 10.1038/ncb2465.
- Downs, J. A.; Lowndes, N. F.; Jackson, S. P. (2000): A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. In: *Nature* 408 (6815), S. 1001–1004. DOI: 10.1038/35050000.
- Dutertre, S.; Ababou, M.; Onclercq, R.; Delic, J.; Chatton, B.; Jaulin, C.; Amor-Guéret, M. (2000): Cell cycle regulation of the endogenous wild type Bloom's syndrome DNA helicase. In: *Oncogene* 19 (23), S. 2731–2738. DOI: 10.1038/sj.onc.1203595.
- Dynan, W. S.; Yoo, S. (1998): Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. In: *Nucleic Acids Research* 26 (7), S. 1551–1559. DOI: 10.1093/nar/26.7.1551.
- Fanning, E. (2006): A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. In: *Nucleic Acids Research* 34 (15), S. 4126–4137. DOI: 10.1093/nar/gkl550.
- Fekairi, Samira; Scaglione, Sarah; Chahwan, Charly; Taylor, Ewan R.; Tissier, Agnès; Coulon, Stéphane et al. (2009): Human SLX4 Is a Holliday Junction Resolvase Subunit that Binds Multiple DNA Repair/Recombination Endonucleases. In: *Cell* 138 (1), S. 78–89. DOI: 10.1016/j.cell.2009.06.029.
- Forget, Anthony L.; Kowalczykowski, Stephen C. (2012): Single-molecule imaging of DNA pairing by RecA reveals a three-dimensional homology search. In: *Nature* 482 (7385), S. 423–427. DOI: 10.1038/nature10782.
- Fradet-Turcotte, Amélie; Canny, Marella D.; Escribano-Díaz, Cristina; Orthwein, Alexandre; Leung, Charles C. Y.; Huang, Hao et al. (2013): 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. In: *Nature* 499 (7456), S. 50–54. DOI: 10.1038/nature12318.
- Fricke, W. M. (2003): Slx1--Slx4 is a second structure-specific endonuclease functionally redundant with Sgs1--Top3. In: *Genes & Development* 17 (14), S. 1768–1778. DOI: 10.1101/gad.1105203.
-

-
- Fricke, William M.; Bastin-Shanower, Suzanne A.; Brill, Steven J. (2005): Substrate specificity of the *Saccharomyces cerevisiae* Mus81–Mms4 endonuclease. In: *DNA Repair* 4 (2), S. 243–251. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.10.001.
- Frit, Philippe; Barboule, Nadia; Yuan, Ying; Gomez, Dennis; Calsou, Patrick (2014): Alternative end-joining pathway(s). Bricolage at DNA breaks. In: *DNA Repair* 17, S. 81–97. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.02.007.
- Fugmann, S. D.; Lee, A. I.; Shockett, P. E.; Villey, I. J.; Schatz, D. G. (2000): The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. In: *Annual review of immunology* 18, S. 495–527. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.495.
- Fuller, Lloyd F.; Painter, Robert B. (1988): A Chinese hamster ovary cell line hypersensitive to ionizing radiation and deficient in repair replication. In: *Mutation Research/DNA Repair Reports* 193 (2), S. 109–121. DOI: 10.1016/0167-8817(88)90041-7.
- Furnari, B.; Rhind, N.; Russell, P. (1997): Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. In: *Science (New York, N.Y.)* 277 (5331), S. 1495–1497.
- Gabrielli, B. G.; Souza, C. P. de; Tonks, I. D.; Clark, J. M.; Hayward, N. K.; Ellem, K. A. (1996): Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. In: *Journal of Cell Science* 109 (Pt 5), S. 1081–1093.
- Gaillard, Pierre-Henri L.; Noguchi, Eishi; Shanahan, Paul; Russell, Paul (2003): The Endogenous Mus81-Eme1 Complex Resolves Holliday Junctions by a Nick and Counternick Mechanism. In: *Molecular Cell* 12 (3), S. 747–759. DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00342-3.
- Gao, H. (2003): Mus81 Endonuclease Localizes to Nucleoli and to Regions of DNA Damage in Human S-phase Cells. In: *Molecular Biology of the Cell* 14 (12), S. 4826–4834. DOI: 10.1091/mbc.E03-05-0276.
- Garcia, Valerie; Phelps, Sarah E. L.; Gray, Stephen; Neale, Matthew J. (2011): Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. In: *Nature* 479 (7372), S. 241–244. DOI: 10.1038/nature10515.
- Gatti, Marco; Pinato, Sabrina; Maspero, Elena; Soffientini, Paolo; Polo, Simona; Penengo, Lorenza (2012): A novel ubiquitin mark at the N-terminal tail of histone H2As targeted by RNF168 ubiquitin ligase. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 11 (13), S. 2538–2544. DOI: 10.4161/cc.20919.
- Gehlen, Lutz R.; Gasser, Susan M.; Dion, Vincent (2011): How Broken DNA Finds Its Template for Repair. A Computational Approach. In: *Prog. Theor. Phys. Suppl.* 191, S. 20–29. DOI: 10.1143/PTPS.191.20.
- Gelot, Camille; Magdalou, Indiana; Lopez, Bernard (2015): Replication Stress in Mammalian Cells and Its Consequences for Mitosis. In: *Genes* 6 (2), S. 267–298. DOI: 10.3390/genes6020267.
- Girard, F.; Strausfeld, U.; Fernandez, A.; Lamb, N. J. (1991): Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. In: *Cell* 67 (6), S. 1169–1179.
- Giunta, Simona; Belotserkovskaya, Rimma; Jackson, Stephen P. (2010): DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. In: *J Cell Biol* 190 (2), S. 197–207. DOI: 10.1083/jcb.200911156.
- Gotoh et al. (1995): Inhibition of protein serine/threonine phosphatases directly induces premature chromosome condensation in mammalian somatic cells. In: *Biomedical Research* (16), S. 63–68.
- Grabarz, Anastazja; Barascu, Aurélie; Guirouilh-Barbat, Josée; Lopez, Bernard S. (2012): Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. In: *American journal of cancer research* 2 (3), S. 249–268.
-

- Gravel, S.; Chapman, J. R.; Magill, C.; Jackson, S. P. (2008): DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. In: *Genes & Development* 22 (20), S. 2767–2772. DOI: 10.1101/gad.503108.
- Griffin, C. S.; Simpson, P. J.; Wilson, C. R.; Thacker, J. (2000): Mammalian recombination-repair genes XRCC2 and XRCC3 promote correct chromosome segregation. In: *Nature cell biology* 2 (10), S. 757–761. DOI: 10.1038/35036399.
- Hanno Krieger (2007): Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes. 2. Auflage. Wiesbaden: B. G. Teubner Verlag / GWV Fachverlage GmbH.
- Hans, F.; Dimitrov, S. (2001): Histone H3 phosphorylation and cell division. In: *Oncogene* 20 (24), S. 3021–3027. DOI: 10.1038/sj.onc.1204326.
- Hara, Masatoshi; Abe, Yusuke; Tanaka, Toshiaki; Yamamoto, Takayoshi; Okumura, Eiichi; Kishimoto, Takeo (2012): Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase-promoting factor. In: *Nat Comms* 3, S. 1059. DOI: 10.1038/ncomms2062.
- Harada, J. J.; Morris, D. R. (1981): Cell cycle parameters of Chinese hamster ovary cells during exponential, polyamine-limited growth. In: *Molecular and Cellular Biology* 1 (7), S. 594–599.
- Hartlerode, Andrea J.; Morgan, Mary J.; Wu, Yipin; Buis, Jeffrey; Ferguson, David O. (2015): Recruitment and activation of the ATM kinase in the absence of DNA-damage sensors. In: *Nat Struct Mol Biol* 22 (9), S. 736–743. DOI: 10.1038/nsmb.3072.
- Heyer, Wolf-Dietrich (2004): Recombination. Holliday Junction Resolution and Crossover Formation. In: *Current Biology* 14 (2), S. R56-R58. DOI: 10.1016/j.cub.2003.12.043.
- Heyer, Wolf-Dietrich; Ehmsen, Kirk T.; Liu, Jie (2010): Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. In: *Annu. Rev. Genet.* 44 (1), S. 113–139. DOI: 10.1146/annurev-genet-051710-150955.
- Hinz, John M.; Tebbs, Robert S.; Wilson, Paul F.; Nham, Peter B.; Salazar, Edmund P.; Nagasawa, Hatsumi et al. (2006): Repression of mutagenesis by Rad51D-mediated homologous recombination. In: *Nucleic Acids Research* 34 (5), S. 1358–1368. DOI: 10.1093/nar/gkl020.
- Holliday, Robin (2007): A mechanism for gene conversion in fungi. In: *Genetical research* 89 (5-6), S. 285–307. DOI: 10.1017/S0016672308009476.
- Hollingsworth, Nancy M.; Brill, Steven J. (2004): The Mus81 solution to resolution: generating meiotic crossovers without Holliday junctions. In: *Genes & Development* 18 (2), S. 117–125. DOI: 10.1101/gad.1165904.
- House, Nealia C. M.; Koch, Melissa R.; Freudenreich, Catherine H. (2014): Chromatin modifications and DNA repair. Beyond double-strand breaks. In: *Front. Genet.* 5 (2084), S. 15966. DOI: 10.3389/fgene.2014.00296.
- Huang, Fei; Motlekar, Nuzhat A.; Burgwin, Chelsea M.; Napper, Andrew D.; Diamond, Scott L.; Mazin, Alexander V. (2011): Identification of specific inhibitors of human RAD51 recombinase using high-throughput screening. In: *ACS chemical biology* 6 (6), S. 628–635. DOI: 10.1021/cb100428c.
- Iliakis, G. (1991): The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 13 (12), S. 641–648. DOI: 10.1002/bies.950131204.
- Ip, Stephen C. Y.; Rass, Ulrich; Blanco, Miguel G.; Flynn, Helen R.; Skehel, J. Mark; West, Stephen C. (2008): Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. In: *Nature* 456 (7220), S. 357–361. DOI: 10.1038/nature07470.
- Ishihara, H.; Martin, B. L.; Brautigan, D. L.; Karaki, H.; Ozaki, H.; Kato, Y. et al. (1989): Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. In: *Biochemical and biophysical research communications* 159 (3), S. 871–877.

-
- Ismail, Ismail Hassan; Andrin, Christi; McDonald, Darin; Hendzel, Michael J. (2010): BMI1-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair. In: *J Cell Biol* 191 (1), S. 45–60. DOI: 10.1083/jcb.201003034.
- Jager, Martijn de; van Noort, John; van Gent, Dik C.; Dekker, Cees; Kanaar, Roland; Wyman, Claire (2001): Human Rad50/Mre11 Is a Flexible Complex that Can Tether DNA Ends. In: *Molecular Cell* 8 (5), S. 1129–1135. DOI: 10.1016/S1097-2765(01)00381-1.
- Jeggo, Penny A.; Löbrich, Markus (2006): Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. In: *DNA Repair* 5 (9-10), S. 1192–1198. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.05.011.
- Jordan, Mary Ann; Wilson, Leslie (2004): Microtubules as a target for anticancer drugs. In: *Nature reviews. Cancer* 4 (4), S. 253–265. DOI: 10.1038/nrc1317.
- Keeney, S.; Giroux, C. N.; Kleckner, N. (1997): Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. In: *Cell* 88 (3), S. 375–384.
- Kegel, Peter; Riballo, Enriqueta; Kühne, Martin; Jeggo, Penny A.; Löbrich, Markus (2007): X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. In: *DNA Repair* 6 (11), S. 1692–1697. DOI: 10.1016/j.dnarep.2007.05.013.
- Kikuchi, K.; Narita, T.; Pham, V. T.; Iijima, J.; Hirota, K.; Keka, I. S. et al. (2013): Structure-Specific Endonucleases Xpf and Mus81 Play Overlapping but Essential Roles in DNA Repair by Homologous Recombination. In: *Cancer Research* 73 (14), S. 4362–4371. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3154.
- King, Randall W.; Jackson, Peter K.; Kirschner, Marc W. (1994): Mitosis in transition. In: *Cell* 79 (4), S. 563–571. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90542-8.
- Kostyrko, Kaja; Bosshard, Sandra; Urban, Zuzanna; Mermoud, Nicolas (2015): A role for homologous recombination proteins in cell cycle regulation. In: *Cell Cycle* 14 (17), S. 2853–2861. DOI: 10.1080/15384101.2015.1049784.
- Krempler, Andrea; Deckbar, Dorothee; Jeggo, Penny A.; Löbrich, Markus (2007): An imperfect G2M checkpoint contributes to chromosome instability following irradiation of S and G2 phase cells. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (14), S. 1682–1686.
- Lange, Titia de (2004): T-loops and the origin of telomeres. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (4), S. 323–329. DOI: 10.1038/nrm1359.
- Lee, Dong-Hyun; Acharya, Sanket S.; Kwon, Mijung; Drane, Pascal; Guan, Yinghua; Adelmant, Guillaume et al. (2014): Dephosphorylation Enables the Recruitment of 53BP1 to Double-Strand DNA Breaks. In: *Molecular Cell* 54 (3), S. 512–525. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.020.
- Lee, Ji-Hoon; Paull, Tanya T. (2005): ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. In: *Science (New York, N.Y.)* 308 (5721), S. 551–554. DOI: 10.1126/science.1108297.
- Leung, Justin W.; Agarwal, Poonam; Canny, Marella D.; Gong, Fade; Robison, Aaron D.; Finkelstein, Ilya J. et al. (2014): Nucleosome Acidic Patch Promotes RNF168- and RING1B/BMI1-Dependent H2AX and H2A Ubiquitination and DNA Damage Signaling. In: *PLoS Genet* 10 (3), S. e1004178. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004178.
- Li, Mischa L.; Greenberg, Roger A. (2012): Links between genome integrity and BRCA1 tumor suppression. In: *Trends in Biochemical Sciences* 37 (10), S. 418–424. DOI: 10.1016/j.tibs.2012.06.007.
- Lieber, Michael R. (2010): The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. In: *Annu. Rev. Biochem.* 79 (1), S. 181–211. DOI: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.
-

-
- Liu, Jie; Doty, Tammy; Gibson, Bryan; Heyer, Wolf-Dietrich (2010): Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. In: *Nat Struct Mol Biol* 17 (10), S. 1260–1262. DOI: 10.1038/nsmb.1904.
- Löbrich, Markus; Shibata, Atsushi; Beucher, Andrea; Fisher, Anna; Ensminger, Michael; Goodarzi, Aaron A. et al. (2010): gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (4), S. 662–669.
- Lukas, Claudia; Savic, Velibor; Bekker-Jensen, Simon; Doil, Carsten; Neumann, Beate; Pedersen, Ronni Sølvhøj et al. (2011a): 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. In: *Nature cell biology* 13 (3), S. 243–253. DOI: 10.1038/ncb2201.
- Lukas, Jiri; Lukas, Claudia; Bartek, Jiri (2004): Mammalian cell cycle checkpoints. Signalling pathways and their organization in space and time. In: *DNA Repair* 3 (8-9), S. 997–1007. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.03.006.
- Lukas, Jiri; Lukas, Claudia; Bartek, Jiri (2011b): More than just a focus. The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. In: *Nat Cell Biol* 13 (10), S. 1161–1169. DOI: 10.1038/ncb2344.
- Lydeard, John R.; Lipkin-Moore, Zachary; Sheu, Yi-Jun; Stillman, Bruce; Burgers, Peter M.; Haber, James E. (2010): Break-induced replication requires all essential DNA replication factors except those specific for pre-RC assembly. In: *Genes & Development* 24 (11), S. 1133–1144. DOI: 10.1101/gad.1922610.
- Ma, Yunmei; Pannicke, Ulrich; Schwarz, Klaus; Lieber, Michael R. (2002): Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination. In: *Cell* 108 (6), S. 781–794. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00671-2.
- Mailand, Niels; Bekker-Jensen, Simon; Fastrup, Helene; Melander, Fredrik; Bartek, Jiri; Lukas, Claudia; Lukas, Jiri (2007): RNF8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins. In: *Cell* 131 (5), S. 887–900. DOI: 10.1016/j.cell.2007.09.040.
- MANKOURI, H.; HICKSON, I. (2007): The RecQ helicase–topoisomerase III–Rmi1 complex. A DNA structure-specific ‘dissolvasome’? In: *Trends in Biochemical Sciences* 32 (12), S. 538–546. DOI: 10.1016/j.tibs.2007.09.009.
- Mansour, Wael Y.; Rhein, Tim; Dahm-Daphi, Jochen (2010): The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. In: *Nucleic Acids Research* 38 (18), S. 6065–6077. DOI: 10.1093/nar/gkq387.
- Matos, Joao; Blanco, Miguel G.; Maslen, Sarah; Skehel, J. Mark; West, Stephen C. (2011): Regulatory Control of the Resolution of DNA Recombination Intermediates during Meiosis and Mitosis. In: *Cell* 147 (1), S. 158–172. DOI: 10.1016/j.cell.2011.08.032.
- Mattiroli, Francesca; Vissers, Joseph H. A.; van Dijk, Willem J.; Ikpa, Pauline; Citterio, Elisabetta; Vermeulen, Wim et al. (2012): RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. In: *Cell* 150 (6), S. 1182–1195. DOI: 10.1016/j.cell.2012.08.005.
- Meek, K.; Douglas, P.; Cui, X.; Ding, Q.; Lees-Miller, S. P. (2007): trans Autophosphorylation at DNA-Dependent Protein Kinase's Two Major Autophosphorylation Site Clusters Facilitates End Processing but Not End Joining. In: *Molecular and Cellular Biology* 27 (10), S. 3881–3890. DOI: 10.1128/MCB.02366-06.
- Mimitou, Eleni P.; Symington, Lorraine S. (2009): Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. In: *Trends in Biochemical Sciences* 34 (5), S. 264–272. DOI: 10.1016/j.tibs.2009.01.010.
-

-
- Mimitou, Eleni P.; Symington, Lorraine S. (2010): Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. In: *EMBO J* 29 (19), S. 3358–3369. DOI: 10.1038/emboj.2010.193.
- Miné-Hattab, Judith; Rothstein, Rodney (2012): Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. In: *Nature cell biology* 14 (5), S. 510–517. DOI: 10.1038/ncb2472.
- Mjelle, Robin; Hegre, Siv Anita; Aas, Per Arne; Slupphaug, Geir; Drabløs, Finn; Sætrum, Pål; Krokan, Hans E. (2015): Cell cycle regulation of human DNA repair and chromatin remodeling genes. In: *DNA Repair* 30, S. 53–67. DOI: 10.1016/j.dnarep.2015.03.007.
- Morgan, D. O. (1995): Principles of CDK regulation. In: *Nature* 374 (6518), S. 131–134. DOI: 10.1038/374131a0.
- Naim, Valeria; Wilhelm, Therese; Debatisse, Michelle; Rosselli, Filippo (2013): ERCC1 and MUS81–EME1 promote sister chromatid separation by processing late replication intermediates at common fragile sites during mitosis. In: *Nat Cell Biol* 15 (8), S. 1008–1015. DOI: 10.1038/ncb2793.
- Nancy 2004 - The Mus81 solution to resolution generating meiotic crossovers without Holliday junctions.
- Neumann, Frank R.; Dion, Vincent; Gehlen, Lutz R.; Tsai-Pflugfelder, Monika; Schmid, Roger; Taddei, Angela; Gasser, Susan M. (2012): Targeted INO80 enhances subnuclear chromatin movement and ectopic homologous recombination. In: *Genes & Development* 26 (4), S. 369–383. DOI: 10.1101/gad.176156.111.
- Newman, Matthew; Murray-Rust, Judith; Lally, John; Rudolf, Jana; Fadden, Andrew; Knowles, Philip P. et al. (2005): Structure of an XPF endonuclease with and without DNA suggests a model for substrate recognition. In: *EMBO J* 24 (5), S. 895–905. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600581.
- Niedernhofer, L. J.; Essers, J.; Weeda, G.; Beverloo, B.; Wit, J. de; Muijtens, M. et al. (2001): The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required for targeted gene replacement in embryonic stem cells. In: *The EMBO Journal* 20 (22), S. 6540–6549. DOI: 10.1093/emboj/20.22.6540.
- Nimonkar, A. V.; Ozsoy, A. Z.; Genschel, J.; Modrich, P.; Kowalczykowski, S. C. (2008): Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (44), S. 16906–16911. DOI: 10.1073/pnas.0809380105.
- Nimonkar, A. V.; Sica, R. A.; Kowalczykowski, S. C. (2009): Rad52 promotes second-end DNA capture in double-stranded break repair to form complement-stabilized joint molecules. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (9), S. 3077–3082. DOI: 10.1073/pnas.0813247106.
- Noon, Angela T.; Goodarzi, Aaron A. (2011): 53BP1-mediated DNA double strand break repair. Insert bad pun here. In: *DNA Repair* 10 (10), S. 1071–1076. DOI: 10.1016/j.dnarep.2011.07.012.
- Ohtsubo, M.; Theodoras, A. M.; Schumacher, J.; Roberts, J. M.; Pagano, M. (1995): Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. In: *Molecular and Cellular Biology* 15 (5), S. 2612–2624.
- Onmeda (1): Ionisierende Strahlung: Reichweite: Photoeffekt & Comptoneffekt. Online verfügbar unter http://www.onmeda.de/strahlenmedizin/ionisierende_strahlung_reichweite-photoeffekt-&-comptoneffekt-2413-3.html (abgerufen am 10.04.2016).
- Onmeda (2): Ionisierende Strahlung: Reichweite: Paarbildung. Online verfügbar unter http://www.onmeda.de/strahlenmedizin/ionisierende_strahlung_reichweite-paarbildung-2413-4.html (abgerufen am 10.04.2016).
-

-
- Orthwein, Alexandre; Fradet-Turcotte, Amélie; Noordermeer, Sylvie M.; Canny, Marella D.; Brun, Catherine M.; Strecker, Jonathan et al. (2014): Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. In: *Science (New York, N.Y.)* 344 (6180), S. 189–193. DOI: 10.1126/science.1248024.
- Osman, Fekret; Dixon, Julie; Doe, Claudette L.; Whitby, Matthew C. (2003): Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: a role for Mus81-Eme1 in meiosis. In: *Molecular Cell* 12 (3), S. 761–774.
- Pagano, M.; Pepperkok, R.; Verde, F.; Ansorge, W.; Draetta, G. (1992): Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. In: *The EMBO Journal* 11 (3), S. 961–971.
- Panier, Stephanie; Boulton, Simon J. (2013): Double-strand break repair. 53BP1 comes into focus. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 15 (1), S. 7–18. DOI: 10.1038/nrm3719.
- Pâques, F.; Haber, J. E. (1999): Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 63 (2), S. 349–404.
- Peng, C. Y.; Graves, P. R.; Thoma, R. S.; Wu, Z.; Shaw, A. S.; Piwnicka-Worms, H. (1997): Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. In: *Science (New York, N.Y.)* 277 (5331), S. 1501–1505.
- Pepe, A.; West, S. C. (2014a): Substrate specificity of the MUS81-EME2 structure selective endonuclease. In: *Nucleic Acids Research* 42 (6), S. 3833–3845. DOI: 10.1093/nar/gkt1333.
- Pepe, Alessandra; West, Stephen C. (2014b): MUS81-EME2 Promotes Replication Fork Restart. In: *Cell Reports* 7 (4), S. 1048–1055. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.04.007.
- Pines, J. (1995): Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. In: *The Biochemical journal* 308 (Pt 3), S. 697–711.
- Polo, S. E.; Jackson, S. P. (2011): Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks. A focus on protein modifications. In: *Genes & Development* 25 (5), S. 409–433. DOI: 10.1101/gad.2021311.
- Ragunathan, Kaushik; Liu, Cheng; Ha, Taekjip (2012): RecA filament sliding on DNA facilitates homology search. In: *eLife* 1, S. e00067. DOI: 10.7554/eLife.00067.
- Ralf, C.; Hickson, I. D.; Wu, L. (2006): The Bloom's Syndrome Helicase Can Promote the Regression of a Model Replication Fork. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (32), S. 22839–22846. DOI: 10.1074/jbc.M604268200.
- Rass, Emilie; Grabarz, Anastazja; Plo, Isabelle; Gautier, Jean; Bertrand, Pascale; Lopez, Bernard S. (2009): Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. In: *Nat Struct Mol Biol* 16 (8), S. 819–824. DOI: 10.1038/nsmb.1641.
- Rass, U.; Compton, S. A.; Matos, J.; Singleton, M. R.; Ip, S. C. Y.; Blanco, M. G. et al. (2010): Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein. In: *Genes & Development* 24 (14), S. 1559–1569. DOI: 10.1101/gad.585310.
- Renkawitz, Jörg; Lademann, Claudio A.; Kalocsay, Marian; Jentsch, Stefan (2013): Monitoring Homology Search during DNA Double-Strand Break Repair In Vivo. In: *Molecular Cell* 50 (2), S. 261–272. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.02.020.
- Resjö, S.; Oknianska, A.; Zolnierowicz, S.; Manganiello, V.; Degerman, E. (1999): Phosphorylation and activation of phosphodiesterase type 3B (PDE3B) in adipocytes in response to serine/threonine phosphatase inhibitors: deactivation of PDE3B in vitro by protein phosphatase type 2A. In: *The Biochemical journal* 341 (Pt 3), S. 839–845.
- Robert, Isabelle; Dantzer, Françoise; Reina-San-Martin, Bernardo (2009): Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. In: *J Exp Med* 206 (5), S. 1047–1056. DOI: 10.1084/jem.20082468.
-

- Rodrigue, A.; Coulombe, Y.; Jacquet, K.; Gagne, J.-P.; Roques, C.; Gobeil, S. et al. (2013): The RAD51 paralogs ensure cellular protection against mitotic defects and aneuploidy. In: *Journal of Cell Science* 126 (1), S. 348–359. DOI: 10.1242/jcs.114595.
- Rogakou, E. P.; Pilch, D. R.; Orr, A. H.; Ivanova, V. S.; Bonner, W. M. (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (10), S. 5858–5868.
- Rupnik, Agnieszka; Grenon, Muriel; Lowndes, Noel (2008): The MRN complex. In: *Current Biology* 18 (11), S. R455–R457. DOI: 10.1016/j.cub.2008.03.040.
- Rupnik, Agnieszka; Lowndes, Noel F.; Grenon, Muriel (2010): MRN and the race to the break. In: *Chromosoma* 119 (2), S. 115–135. DOI: 10.1007/s00412-009-0242-4.
- Sallmyr, A.; Tomkinson, A. E.; Rassool, F. V. (2008): Up-regulation of WRN and DNA ligase III in chronic myeloid leukemia. Consequences for the repair of DNA double-strand breaks. In: *Blood* 112 (4), S. 1413–1423. DOI: 10.1182/blood-2007-07-104257.
- Sarbajna, S.; Davies, D.; West, S. C. (2014): Roles of SLX1-SLX4, MUS81-EME1, and GEN1 in avoiding genome instability and mitotic catastrophe. In: *Genes & Development* 28 (10), S. 1124–1136. DOI: 10.1101/gad.238303.114.
- Sartori, Alessandro A.; Lukas, Claudia; Coates, Julia; Mistrik, Martin; Fu, Shuang; Bartek, Jiri et al. (2007): Human CtIP promotes DNA end resection. In: *Nature* 450 (7169), S. 509–514. DOI: 10.1038/nature06337.
- Savic, Velibor; Yin, Bu; Maas, Nancy L.; Bredemeyer, Andrea L.; Carpenter, Andrea C.; Helmink, Beth A. et al. (2009): Formation of Dynamic γ -H2AX Domains along Broken DNA Strands Is Distinctly Regulated by ATM and MDC1 and Dependent upon H2AX Densities in Chromatin. In: *Molecular Cell* 34 (3), S. 298–310. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.04.012.
- Schwartz, E. K.; Wright, W. D.; Ehmsen, K. T.; Evans, J. E.; Stahlberg, H.; Heyer, W.-D. (2012): Mus81-Mms4 Functions as a Single Heterodimer To Cleave Nicked Intermediates in Recombinational DNA Repair. In: *Molecular and Cellular Biology* 32 (15), S. 3065–3080. DOI: 10.1128/MCB.00547-12.
- Sherr, Charles J. (1993): Mammalian G1 cyclins. In: *Cell* 73 (6), S. 1059–1065. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90636-5.
- Shibata, Atsushi; Conrad, Sandro; Birraux, Julie; Geuting, Verena; Barton, Olivia; Ismail, Amani et al. (2011): Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. In: *The EMBO Journal* 30 (6), S. 1079–1092. DOI: 10.1038/emboj.2011.27.
- Shibata, Atsushi; Moiani, Davide; Arvai, Andrew S.; Perry, Jefferson; Harding, Shane M.; Genoio, Marie-Michelle et al. (2014): DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities. In: *Molecular Cell* 53 (1), S. 7–18. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.11.003.
- Shim, Eun Yong; Chung, Woo-Hyun; Nicolette, Matthew L.; Zhang, Yu; Davis, Melody; Zhu, Zhu et al. (2010): *Saccharomyces cerevisiae* Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku proteins regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks. In: *EMBO J* 29 (19), S. 3370–3380. DOI: 10.1038/emboj.2010.219.
- Shim, Grace; Ricoul, Michelle; Hempel, William M.; Azzam, Edouard I.; Sabatier, Laure (2014): Crosstalk between telomere maintenance and radiation effects. A key player in the process of radiation-induced carcinogenesis. In: *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 760, S. 1–17. DOI: 10.1016/j.mrrev.2014.01.001.
- Shrivastav, Meena; Haro, Leyma P. de; Nickoloff, Jac A. (2008): Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. In: *Cell Res* 18 (1), S. 134–147. DOI: 10.1038/cr.2007.111.

-
- Sijbers, Anneke M.; Laat, Wouter L. de; Ariza, Rafael R.; Biggerstaff, Maureen; Wei, Ying-Fei; Moggs, Jonathan G. et al. (1996): Xeroderma Pigmentosum Group F Caused by a Defect in a Structure-Specific DNA Repair Endonuclease. In: *Cell* 86 (5), S. 811–822. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80155-5.
- Simsek, Deniz; Brunet, Erika; Wong, Sunnie Yan-Wai; Katyal, Sachin; Gao, Yankun; McKinnon, Peter J. et al. (2011): DNA Ligase III Promotes Alternative Nonhomologous End-Joining during Chromosomal Translocation Formation. In: *PLoS Genet* 7 (6), S. e1002080. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002080.
- Sneeden, J. L.; Grossi, S. M.; Tappin, I.; Hurwitz, J.; Heyer, W.-D. (2013): Reconstitution of recombination-associated DNA synthesis with human proteins. In: *Nucleic Acids Research* 41 (9), S. 4913–4925. DOI: 10.1093/nar/gkt192.
- Solinger, J. A.; Heyer, W.-D. (2001): Rad54 protein stimulates the postsynaptic phase of Rad51 protein-mediated DNA strand exchange. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (15), S. 8447–8453. DOI: 10.1073/pnas.121009898.
- Solinger, Jachen A.; Kiianitsa, Konstantin; Heyer, Wolf-Dietrich (2002): Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51:dsDNA filaments. In: *Molecular Cell* 10 (5), S. 1175–1188.
- Soni, A. (2010): The Role of Homologous Recombination Repair in the processing of G2-chromosomal breaks and maintenance of G2-checkpoint. Dissertation. Universität Duisburg-Essen, Essen. Institut für medizinische Strahlenbiologie.
- Sonoda, E. (1998): Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. In: *The EMBO Journal* 17 (2), S. 598–608. DOI: 10.1093/emboj/17.2.598.
- Spagnolo, Laura; Rivera-Calzada, Angel; Pearl, Laurence H.; Llorca, Oscar (2006): Three-Dimensional Structure of the Human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 Complex Assembled on DNA and Its Implications for DNA DSB Repair. In: *Molecular Cell* 22 (4), S. 511–519. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.04.013.
- Stucki, Manuel; Jackson, Stephen P. (2006): γ H2AX and MDC1. Anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. In: *DNA Repair* 5 (5), S. 534–543. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.01.012.
- Sun, J.; Lee, K.-J.; Davis, A. J.; Chen, D. J. (2012): Human Ku70/80 Protein Blocks Exonuclease 1-mediated DNA Resection in the Presence of Human Mre11 or Mre11/Rad50 Protein Complex. In: *Journal of Biological Chemistry* 287 (7), S. 4936–4945. DOI: 10.1074/jbc.M111.306167.
- Sung, P. (1994): Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. In: *Science (New York, N.Y.)* 265 (5176), S. 1241–1243.
- Suwaki, Natsuko; Klare, Kerstin; Tarsounas, Madalena (2011): RAD51 paralogs. Roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22 (8), S. 898–905. DOI: 10.1016/j.semcdb.2011.07.019.
- Symington, L. S. (2002): Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (4), S. 630–670. DOI: 10.1128/MMBR.66.4.630-670.2002.
- Taubmann, A. (2015): Untersuchung der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur über Homologe Rekombination am Übergang von der G2-Phase in die Mitose. Dissertation. Technische Universität Darmstadt, Darmstadt. Radiation Biology and DNA Repair.
- Taylor, William R.; Stark, George R. (2001): Regulation of the G2/M transition by p53. In: *Oncogene* 20 (15), S. 1803–1815. DOI: 10.1038/sj.onc.1204252.
-

- Tebbs, R. S.; Zhao, Y.; Tucker, J. D.; Scheerer, J. B.; Siciliano, M. J.; Hwang, M. et al. (1995): Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (14), S. 6354–6358.
- Terasawa, M.; Ogawa, H.; Tsukamoto, Y.; Shinohara, M.; Shirahige, K.; Kleckner, N.; Ogawa, T. (2007): Meiotic recombination-related DNA synthesis and its implications for cross-over and non-cross-over recombinant formation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (14), S. 5965–5970. DOI: 10.1073/pnas.0611490104.
- Thompson, Larry H. (2012): Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells. The molecular choreography. In: *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 751 (2), S. 158–246. DOI: 10.1016/j.mrrev.2012.06.002.
- Truong, L. N.; Li, Y.; Shi, L. Z.; Hwang, P. Y.-H.; He, J.; Wang, H. et al. (2013): Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (19), S. 7720–7725. DOI: 10.1073/pnas.1213431110.
- Uematsu, Naoya; Weterings, Eric; Yano, Ken-ichi; Morotomi-Yano, Keiko; Jakob, Burkhard; Taucher-Scholz, Gisela et al. (2007): Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. In: *The Journal of cell biology* 177 (2), S. 219–229. DOI: 10.1083/jcb.200608077.
- Uziel, Tamar; Lerenthal, Yaniv; Moyal, Lilach; Andegeko, Yair; Mittelman, Leonid; Shiloh, Yosef (2003): Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. In: *The EMBO Journal* 22 (20), S. 5612–5621. DOI: 10.1093/emboj/cdg541.
- van Brabant, Anja J.; Ye, Tian; Sanz, Maureen; German, James L.; Ellis, Nathan A.; Holloman, William K. (2000): Binding and Melting of D-Loops by the Bloom Syndrome Helicase †. In: *Biochemistry* 39 (47), S. 14617–14625. DOI: 10.1021/bi0018640.
- van Dyck, E.; Stasiak, A. Z.; Stasiak, A.; West, S. C. (2001): Visualization of recombination intermediates produced by RAD52-mediated single-strand annealing. In: *EMBO reports* 2 (10), S. 905–909. DOI: 10.1093/embo-reports/kve201.
- Walker, J. R.; Corpina, R. A.; Goldberg, J. (2001): Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. In: *Nature* 412 (6847), S. 607–614. DOI: 10.1038/35088000.
- Wang, Huichen; Zeng, Zhao-Chong; Bui, Tu-Anh; Sonoda, Eiichiro; Takata, Minoru; Takeda, Shunichi; Iliakis, George (2001): Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. In: *Oncogene* 20 (18), S. 2212–2224. DOI: 10.1038/sj.onc.1204350.
- Wang, M.; Wu, W.; Rosidi, B.; Zhang, L.; Wang, H.; Iliakis, G. (2006): PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. In: *Nucleic Acids Research* 34 (21), S. 6170–6182. DOI: 10.1093/nar/gkl840.
- Ward, Jordan D.; Muzzini, Diego M.; Petalcorin, Mark I. R.; Martinez-Perez, Enrique; Martin, Julie S.; Plevani, Paolo et al. (2010): Overlapping mechanisms promote postsynaptic RAD-51 filament disassembly during meiotic double-strand break repair. In: *Molecular Cell* 37 (2), S. 259–272. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.12.026.
- Weterings, Eric; Chen, David J. (2007): DNA-dependent protein kinase in nonhomologous end joining. A lock with multiple keys? In: *J Cell Biol* 179 (2), S. 183–186. DOI: 10.1083/jcb.200705106.
- Whitby, M. C. (2002): Cleavage of Model Replication Forks by Fission Yeast Mus81-Eme1 and Budding Yeast Mus81-Mms4. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (9), S. 6928–6935. DOI: 10.1074/jbc.M210006200.

-
- Wu, D.; Topper, L. M.; Wilson, T. E. (2008): Recruitment and Dissociation of Nonhomologous End Joining Proteins at a DNA Double-Strand Break in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Genetics* 178 (3), S. 1237–1249. DOI: 10.1534/genetics.107.083535.
- Wu, L.; Bachrati, C. Z.; Ou, J.; Xu, C.; Yin, J.; Chang, M. et al. (2006): BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (11), S. 4068–4073. DOI: 10.1073/pnas.0508295103.
- Wu, Leonard; Hickson, Ian D. (2003): The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. In: *Nature* 426 (6968), S. 870–874. DOI: 10.1038/nature02253.
- Wyatt, Haley D.M.; Sarbajna, Shriparna; Matos, Joao; West, Stephen C. (2013): Coordinated Actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for Holliday Junction Resolution in Human Cells. In: *Molecular Cell* 52 (2), S. 234–247. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.08.035.
- Yam, C. H.; Fung, T. K.; Poon, R. Y. C. (2002): Cyclin A in cell cycle control and cancer. In: *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 59 (8), S. 1317–1326. DOI: 10.1007/s00018-002-8510-y.
- Yang, Haijuan; Li, Qiubai; Fan, Jie; Holloman, William K.; Pavletich, Nikola P. (2005): The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction. In: *Nature* 433 (7026), S. 653–657. DOI: 10.1038/nature03234.
- Yang, Hailing; Ganguly, Anutosh; Cabral, Fernando (2010a): Inhibition of cell migration and cell division correlates with distinct effects of microtubule inhibiting drugs. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (42), S. 32242–32250. DOI: 10.1074/jbc.M110.160820.
- Yang, J.; Bachrati, C. Z.; Ou, J.; Hickson, I. D.; Brown, G. W. (2010b): Human Topoisomerase III Is a Single-stranded DNA Decatenase That Is Stimulated by BLM and RMI1. In: *Journal of Biological Chemistry* 285 (28), S. 21426–21436. DOI: 10.1074/jbc.M110.123216.
- Ying, Songmin; Minocherhomji, Sheroy; Chan, Kok Lung; Palmai-Pallag, Timea; Chu, Wai Kit; Wass, Theresa et al. (2013): MUS81 promotes common fragile site expression. In: *Nat Cell Biol* 15 (8), S. 1001–1007. DOI: 10.1038/ncb2773.
- Zhou, Yi; Caron, Pierre; Legube, Gaëlle; Paull, Tanya T. (2014): Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells. In: *Nucleic Acids Research* 42 (3), S. e19. DOI: 10.1093/nar/gkt1309.
- Zhu, Zhu; Chung, Woo-Hyun; Shim, Eun Yong; Lee, Sang Eun; Ira, Grzegorz (2008): Sgs1 Helicase and Two Nucleases Dna2 and Exo1 Resect DNA Double-Strand Break Ends. In: *Cell* 134 (6), S. 981–994. DOI: 10.1016/j.cell.2008.08.037.

8 Anhang

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Johannes Wess
Geburtsdatum: 10. Juni 1985
Geburtsort: Hanau
Staatsangehörigkeit: deutsch

Berufstätigkeit im Rahmen der Promotion

03/2011 - 05/2016 **Technische Universität Darmstadt**
Biologie - Schwerpunkt: Strahlenbiologie und DNA Reparatur
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Markus Löbrich

Studium

10/2004 – 08/2010 **Goethe-Universität Frankfurt am Main**
Studienfach Biologie - Schwerpunkt: Genetik
Abschluss: Diplom

Außeruniversitäre Ausbildung

2004 – 2008 **Bischöfliches Kirchenmusikinstitut der Diözese Fulda**
C-Prüfung zum nebenberuflichen Kirchenmusiker

Schulbildung

1995 – 2004 **Hohe Landesschule Hanau, Gymnasium**
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1991 – 1995 **Grundschule Langendiebach**

Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich für die Möglichkeit danken, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Ebenso danke ich ihm für die intensiven und produktiven Diskussionen sowie für seine Unterstützung und Anregungen.

Ebenso möchte ich mich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 1657 ("Radiation Biology") bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Gisela Taucher-Scholz möchte ich mich rechtherzlich für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken.

Frau Prof. Dr. Beatrix Süß und Herrn Prof. Dr. Franz Rödel danke ich für die freundliche Bereitschaft als Prüfer/in an meiner Disputation teilzunehmen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Dr. Dorothee Deckbar für die intensive, phasenweise gar aufopferungsvolle, tolle Betreuung und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Desweiteren möchte ich ihr stets offenes Ohr sowie die äußerst angenehme Kommunikationsatmosphäre loben. Es hat mir viel Spaß gemacht mit Dir zusammenzuarbeiten!

Den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Löbrich danke ich für die Unterstützung in Form von Diskussionsbereitschaft, Hilfestellungen und Tips und Tricks im Labor sowie für den Zusammenhalt, ein tolles Arbeitsklima und nicht zu vergessen den Spaß bei der Arbeit. Dem TA-Team danke ich besonders für eine hervorragende Organisation und den reibungslosen Ablauf des Laboralltages.

Besonders meiner Familie, aber auch meinen Freunden gilt ein nicht in Worte zu fassender Dank. Sie haben mich immer unterstützt und waren zu jeder Zeit mein Rückhalt. Meiner Freundin und Lebensgefährtin danke ich darüber hinaus für ihre liebevolle Fürsorge sowie für ihre Nachsicht.

Danke Mama, danke Papa, ohne Euch wäre dies Alles niemals möglich gewesen!

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 3. Mai 2016

(Johannes Wess)